

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Química Física Aplicada



TESIS DOCTORAL

**DISEÑO Y EVALUACIÓN DE UN COMPLEMENTO NUTRICIONAL
ENRIQUECIDO EN LÍPIDOS POLARES DE ORIGEN LÁCTEO Y MARINO
PARA LA PREVENCIÓN DEL DETERIORO COGNITIVO EN RATAS DE
EDAD AVANZADA**

ALBA MARÍA GARCÍA SERRANO



**INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS DE LA ALIMENTACIÓN
(CIAL, CSIC-UAM)**

Madrid, 2017

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA-FÍSICA APLICADA



**DISEÑO Y EVALUACIÓN DE UN COMPLEMENTO
NUTRICIONAL ENRIQUECIDO EN LÍPIDOS POLARES DE
ORIGEN LÁCTEO Y MARINO PARA LA PREVENCIÓN DEL
DETERIORO COGNITIVO EN RATAS DE EDAD AVANZADA**



Memoria presentada por

ALBA MARÍA GARCÍA SERRANO

Para optar al grado de:

Doctor en Biología y Ciencias de la Alimentación

Trabajo realizado bajo la dirección de:

Dr. Fco. Javier Fontecha Alonso

Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL)

Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)



FRANCISCO JAVIER FONTECHA ALONSO, DOCTOR EN CIENCIAS QUÍMICAS E INVESTIGADOR CIENTÍFICO DEL CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS EN EL INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS DE LA ALIMENTACIÓN

CERTIFICA:

Que el trabajo titulado: **“Diseño y evaluación de un complemento nutricional enriquecido en lípidos polares de origen lácteo y marino para la prevención del deterioro cognitivo en ratas de edad avanzada”**, que constituye la Memoria que presenta Alba María García Serrano, ha sido realizado en el Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas bajo mi dirección y cumple las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid y, por tanto, autorizo su presentación.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmo el presente Certificado en Madrid a ___ de junio de 2017.

Fco. Javier Fontecha Alonso

Este trabajo ha sido ha sido desarrollado dentro del marco de un Proyecto del Programa Estatal de I+D+i referencia: AGL2014-56464, que lleva por título “Diseño y evaluación de un complemento nutricional enriquecido en fosfolípidos bioactivos para la prevención del deterioro cognitivo leve asociado al envejecimiento” en el Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación.

Ha llegado el día de ser consciente de todo lo que han dado de sí estos últimos años, y lo cierto es que han dado para mucho.

En primer lugar, quisiera agradecer a mi director de Tesis, Javier Fontecha, por marcarme los pasos y dejarme marcar los míos propios en el mundo de la Ciencia. Agradecerte toda la paciencia y confianza que has depositado en mí, y todos los debates que daban lugar a respuestas para seguir avanzando en el camino correcto. No hay duda de que la frase que nos repetías “mi puerta está abierta para cualquier cosa que necesitéis”, se llevaba a la práctica. Recuerdo cuando empecé mis pasos en el CIAL y me ofreciste la oportunidad de empezar la Tesis Doctoral en tu Grupo de Investigación. Lo contaba a mis antiguos compañeros y respondían “¿vas a trabajar con Fontecha? ¡qué bien, parece buen jefe!”. No se equivocaban.

Por supuesto, agradecer la constante presencia de Manuela Juárez por su capacidad innata de transmitir toda la energía y el espíritu investigador en los primeros pasos en los que he tenido la gran oportunidad de conocerla. Las personas con tanta voluntad, son las que hacen este camino más fácil de seguir.

Al Departamento de Química-Física Aplicada de la Universidad Autónoma de Madrid, y muy especialmente a mi tutora Diana Martín, por “pulsar el botoncito” que hizo que ahora me encuentre escribiendo los agradecimientos de mi Tesis Doctoral. Gracias por estar desde el principio enseñándome y, sobre todo, acompañándome.

A mis compañeros de laboratorio, Mariví, por sus enseñanzas y sus conversaciones que siempre hacen sacar risas por cualquier motivo (aunque digas que ya he crecido, no dejes de llamarme “Albíta”, porfa). A Mariuca, porque te saca tu mejor cara ya desde el fondo del pasillo, y de ella he aprendido que la vida hay que tomársela con gracia y actitud; eres una valiente. A Doñoro, por ser compañero de guerra dentro y fuera del CIAL (¡deberíamos vernos más!). A Elena y a Javi, los “Tecs al poder!” por ser mis manos cuando las mías no daban abasto y aguantarme siempre con una sonrisa (y un poco-mucho sarcasmo) en la boca, ¡podéis con todo, chicos! A mis compañeros eventuales de Trabajo de Fin de Máster, estancias, etc.: Latifa, JJ, y, en especial, a Loreto, Natalia y Samira. Ha sido genial conocer a grandes personas que en tan poco tiempo han dado tanta vida a la rutina de laboratorio. Dicen que lo bueno, si breve, dos veces bueno. Con vosotras no estoy de acuerdo, así que nos vemos pronto en cualquier parte del mundo.

Al doctor Olimpio Montero del Centre for Biotechnology Development (CDB), por mostrarse tan dispuesto a colaborar en todo lo que implique avanzar en Ciencia. Me quedo con la “espinita” de aprender de su investigación en el futuro. Al doctor César Venero, del Departamento de Psicobiología de la UNED, por su predisposición a enseñarme todo lo posible en psicología animal y su forma de trabajar tan analítica y, a la vez, tan necesaria en “este mundo”.

A esas personas del CIAL que de no ser por ellas, el Instituto no sería lo mismo, Tiziana, Macarena, Josefina. Y a los que le dan el toque especial: Julia, Evita, Jose (mantenimiento),

Eli... ¡le poneis “salero” a la rutina! A mis vecinos de Biopep, que me han amenizado la escritura de la Tesis entre hidrolizados y risas. A J. Mendiola, por pelearse con el PLE cuando yo no podía con él, gracias por tu predisposición.

Por supuesto teníais que aparecer por aquí las “Zanus”. Habéis hecho de esta época una de las más felices de mi vida... no he llorado tanto de risa como con vosotras. A Cris, que nos conocimos tímidamente en la carrera, y ahora hasta nos vestimos igual sin querer... Me siento muy afortunada de ser tu gemela de Tesis yendo de la mano, no podría compartir esta etapa con nadie mejor que contigo. A Pili, por ser mi mentora en la Ciencia y, lo que es más importante, en la amistad. Me has hecho aprender como “científica”, pero también como persona, así que cualquier cosa que ponga para agradecerte se queda corta, como los incontables momentos vividos y por vivir.

A mis “Bfonitas” y a mis “Misses”, por preguntarme por la Tesis aunque nunca les quedase claro lo que estaba haciendo. ¡Prometo volver a mi nivel de rareza normal tras esta etapa! Lleváis años aguantándome, y aún no sé cómo lo seguís haciendo... Creo que debería empezar a daros más abrazos de esos que me decís que nunca doy. Os hacéis querer mucho, guapitas.

A mis compañeros de comida (y lo que no son comidas...), Pila, Marta, Elvi, Tomi, el Sr Cuellar, Clara, Alberto, Pablo, y como no, Dani “wey”, siempre contagiándonos su alegría por la vida. Me habéis hecho vivir momentos memorables que no van a acabar aquí. Gracias de verdad.

A mis almerienses favoritos (casi ya madrileños, que os quejáis de que no tenemos playa pero bien que venís...). Me ha encantado conocerlos de repente y que estéis tan presentes en mi vida “como quien no quiere la cosa”.

A esos -Lípidos de la UAM- que me vieron nacer en el CIAL, Inesikar, Osquitar, y cómo no, Víctor (¡con un compi de piso nunca se acaba la amistad!). Y a los que también me vieron desde fuera del labo, Maiki, Juanan, Ana, Andrea, Lidia, David, Alexis, Gonzalo,... sois tan diferentes como geniales. Gracias por darme un inicio en el que llorar de la risa era rutina.

A mis abuelos y tíos, por preguntarme cómo va todo esperando siempre la mejor respuesta. Gracias por confiar en mí.

A Robles, por hacer que -felicidad- y -facilidad- sean sinónimos. No tengo “gracias” suficientes para valorarte por ser mi escudo y mi espada a la vez. Me queda todo por aprender de ti.

A mi hermano, por tener un corazón enorme, por crear el vínculo que hemos formado con el tiempo y la distancia. Siempre estás cerca aunque la gente no se lo crea. Eres la persona que me ha hecho tener algo de cariño por Inglaterra, ¡y eso era difícil de conseguir!

Por último, y muy especialmente, a mis padres, Marisa y Miguel Ángel, porque habéis sido claves en todas las etapas de mi vida, y mucho más en esta. Gracias por ser el reflejo de la constancia y del esfuerzo, y por darme todo sin pedirlo. Gracias por haberme abierto el camino en todas las elecciones que he tomado, por respetarlas y apoyarlas, y por vuestra eterna voluntad por hacerme feliz.

*“A dream you dream alone is only a dream,
a dream you dream together is reality”.*

John Lennon.

Lista de abreviaturas

AA: ácido araquidónico

AAL: ácido alpha- linolénico

AF: ácido fosfatídico

AG: ácido graso

AGCC: ácidos grasos de cadena corta

AGL: ácidos grasos libres

AGMI: ácidos grasos monoinsaturados

AGPI: ácidos grasos poliinsaturados

AGPICL: ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga

AGS: ácidos grasos saturados

AK: aceite de krill

AL: ácido linoleico

AO: ácido oleico

AP: área alrededor de la plataforma

CAK: concentrado en lípidos polares de aceite de krill

CB: cerebelo

Cer: ceramidas

CF: corteza frontal

CGMz: concentrado de grasa de mazada

CL: clases lipídicas

CLA: ácido linoleico conjugado

CM: condicionamiento del miedo

CMC: condicionamiento del miedo al contexto

CMz: concentrado en lípidos polares de mazada

CO: corteza occipital

Col: colesterol

CT: corteza temporal

DCL: deterioro cognitivo leve

DG: diglicéridos

DHA: ácido docosahexaenoico

DMA: dimetilacetal

DMF: dimetilformamida

DPA: ácido docosapentaenoico

EA: enfermedad de Alzheimer

EC: éster de colesterol

ECV: enfermedades cardiovasculares

ELSD: detector evaporativo de dispersión de luz

EM: esfingomielina

EMAG: ésteres metílicos de ácidos grasos

EPA: ácido eicosapentaenoico

Erit: eritrocitos

FC: fosfatidilcolina

FE: fosfatidiletanolamina

FI: fosfatidilinositol

FL: fosfolípidos

FS: fosfatidilserina

FSP: fase superior polar

GC: cromatografía de gases

GFL: glicerofosfolípidos

Glucer: glucosilceramida

GMz: grasa e mazada

GRAS: generalmente reconocidos como seguros

H: hígado

HDL: lipoproteínas de alta densidad

HP: hipocampo

HPLC: cromatografía de líquidos de alta resolución

Lacer: lactosilceramida

LDL: lipoproteínas de baja densidad

Leu: leucotrienos

LP: lípidos polares

MG: monoglicéridos

MGGL: membrana del glóbulo graso lácteo

MS: detector de masas

MWM: laberinto acuático de Morris

Mz: mazada

n-3: omega 3

n-6: omega 6

PG: prostaglandinas

PLE: extracción mediante líquidos presurizados

QM: quilomicrones

Q-ToF: cuadrolo- tiempo de vuelo

AR: ácido ruménico

SFE: extracción mediante fluídos supercríticos

SL: esfingolípidos

SPE: extracción en fase sólida

TG: triglicéridos

Tx: tromboxanos

UPLC: cromatografía de líquidos de ultraresolución

VLDL: lipoproteínas de muy baja densidad

ÍNDICE

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	1
1. LÍPIDOS	3
1.1. Lípidos polares	4
2. LECHE Y PRODUCTOS LÁCTEOS COMO FUENTE DE LÍPIDOS POLARES	8
2.1. Mazada como fuente de lípidos polares.....	10
3. FUENTES MARINAS DE LÍPIDOS POLARES	12
3.1. Aceite de krill como fuente de lípidos polares	13
4. EFECTOS BENEFICIOSOS DE LOS LÍPIDOS POLARES Y ACIDOS GRASOS n-3 DE AL DIETA	14
4.1. Efecto en enfermedades cardiovasculares	15
4.2. Efecto en cáncer	17
4.3. Efecto en enfermedades hepáticas.....	18
4.4. Efecto en enfermedades bacterianas y respuesta inmunitaria	19
4.5. Efecto de los lípidos polares y ácidos grasos n-3 a nivel cognitivo	21
 CAPÍTULO II. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO	 25
1. Objetivos	27
2. Plan de trabajo	27
 CAPÍTULO III. OPTIMIZACIÓN DE LOS PROCESOS DE OBTENCIÓN DE CONCENTRADOS RICOS EN LÍPIDOS POLARES DE MAZADA Y KRILL	 29
1. Introducción	31
2. Objetivos	33
3. Materiales y Métodos	33
3.1. Muestras	33
3.2. Reactivos y disolventes	34
3.3. Extracción de grasa de mazada.....	34
3.4. Concentración de lípidos polares.....	34
3.4.1.Fraccionamiento de grasa de mazada.....	34

3.4.2. Fraccionamiento de aceite de krill	35
3.5. Análisis de las clases lipídicas por HPLC-ELSD.....	36
3.6. Análisis en ácidos grasos por GC-MS	37
3.7. Análisis estadístico	38
4. Resultados y discusión	38
4.1. Enriquecimiento en lípidos polares de mazada.....	38
4.2. Fraccionamiento de aceite de krill	45
5. Conclusiones parciales.....	54

CAPÍTULO IV. ESTUDIO PILOTO DE LA BIODISPONIBILIDAD DE CONCENTRADOS RICOS EN LÍPIDOS POLARES DE MAZADA Y KRILL EN RATAS

1. Introducción	57
2. Objetivos	57
3. Materiales y métodos.....	58
3.1. Animales y diseño experimental.....	58
3.2. Extracción de lípidos plasmáticos	58
3.3. Análisis de clases lipídicas por HPLC-ELSD.....	59
3.4. Análisis de ácidos grasos por GC-MS	59
3.5. Análisis estadístico	59
4. Resultados y discusión	59
4.1. Contenido en lípidos plasmáticos.....	59
4.2. Análisis de la composición lipídica plasmática	60
5. Conclusiones parciales.....	71

CAPÍTULO V. ANÁLISIS LIPIDÓMICO DE TEJIDOS DE RATAS DE EDAD AVANZADA SUPLEMENTADAS CON UN COMPLEMENTO NUTRICIONAL RICO EN LÍPIDOS POLARES DE MAZADA Y ACEITE DE KRILL.....

1. Introducción	75
2. Objetivos	76
3. Materiales y métodos.....	76
3.1. Elaboración de los complementos nutricionales ricos en lípidos polares	76
3.2. Animales y diseño experimental	79
3.3. Extracción de la fracción lipídica de los tejidos animales estudiados.....	81
3.4. Composición de las clases lipídicas por HPLC-ELSD	81

3.5. Determinación de esfingolípidos de cerebro mediante UPLC.-QToF-MS	81
3.6. Composición en ácidos grasos por GC-MS.....	82
3.7. Análisis estadístico	83
4. Resultados y discusión	83
4.1. Selección del pienso para alimentación basal de las ratas de estudio	83
4.2. Composición lipídica de los complementos nutricionales ricos en lípidos polares	85
4.3. Composición nutricional total de la dieta basal y complementos nutricionales.....	88
4.4. Efecto de la dieta en la ganancia de peso de los animales	88
4.5. Contenido en lípidos de los tejidos animales	89
4.6. Composición lipídica de tejido adiposo superficial y visceral de los animales	91
4.7. Composición lipídica de hígado de los animales	97
4.8. Composición lipídica de eritrocitos y plasma de los animales	102
4.9. Caracterización de la composición lipídica en las diferentes zonas cerebrales estudiadas	110
4.9.1. Determinación de esfingolípidos de cerebro mediante UPLC-QToF- MS.....	111
4.9.2. Composición de la corteza frontal, tempora y occipital.....	112
4.9.3. Composición del hipocampo de los animales	123
4.9.4. Composición del cerebelo de los animales.....	127
5. Conclusiones parciales.....	131

CAPÍTULO VI. EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN DIETÉTICA CON LÍPIDOS POLARES EN EL COMPORTAMIENTO COGNITIVO Y CONDUCTUAL DE RATAS DE EDAD AVANZADA

1. Introducción	135
2. Objetivos	135
3. Materiales y métodos	136
3.1. Elaboración de los complementos	136
3.2. Animales y diseño experimental	136
3.3. Análisis Estadístico	142
4. Resultados y discusión	143
4.1. Evaluación conductual y cognitiva	143
4.1.1. Efecto de la dieta en el estado de ansiedad de los animales	143

4.1.2. Efecto de la dieta en la capacidad de aprendizaje espacial	144
4.1.2. Efecto de la dieta en la memoria emocional.....	147
5. Conclusiones parciales.....	149
 CAPÍTULO VII. RESUMEN	151
 CAPÍTULO VIII. CONCLUSIONES GENERALES	161
 BIBLIOGRAFÍA	165

1. INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

1. LÍPIDOS

Los lípidos son un conjunto de moléculas orgánicas constituidas principalmente por átomos de carbono e hidrógeno y, en menor medida, por oxígeno; aunque también pueden contener en su estructura azufre, fósforo y nitrógeno. Al tratarse de un grupo muy heterogéneo, cumplen numerosas funciones biológicas imprescindibles en el organismo, entre otras, de la reserva energética (en el caso de los triglicéridos -TG-), función estructural (los fosfolípidos -GFL-, esfingolípidos -SL-, colesterol -Col- de las bicapas que conforman las membranas celulares), reguladora (como en el caso de las hormonas esteroideas), y transportadora (ácidos biliares) (Michael Bockisch, 1998).

En cuanto a su clasificación, se podrían dividir dos grandes grupos de lípidos en función de si poseen en su estructura ácidos grasos (AG) (lípidos saponificables), o no los contienen (lípidos insaponificables). Así, los lípidos saponificables se caracterizan por poder hidrolizarse al contener enlaces éster entre el grupo -COOH (ácido) del AG y el grupo -OH (hidroxilo) de la molécula. En este sentido, los lípidos saponificables pueden ser simples, que son ésteres de ácidos grasos enlazados en una molécula de glicerol (acilglicéridos), o complejos, los cuales, además de contener AG, poseen nitrógeno, fósforo, azufre o glúcidos en su estructura, entre los que se encuentran estructuras como los GFL, SL, cerebrósidos ó gangliósidos. En cuanto a los lípidos insaponificables, este grupo se conforma de terpenoides, esteroides y prostaglandinas (Casimir *et al.*, 2008).

Debido a su importancia a nivel metabólico, los lípidos de nuestra dieta constituyen, junto con las proteínas y los carbohidratos, los componentes más importantes de los alimentos que consumimos. Los lípidos aportan numerosos compuestos bioactivos como los AG, algunos de ellos esenciales (como el ácido linoleico, n-6 -AL- y el ácido linolénico, n-3 -AAL-), que se metabolizan en moléculas con actividad similar a hormonas que regulan muchas de las funciones corporales. Otros lípidos actúan como portadores de vitaminas liposolubles como la vitamina A, D y E (Sargent *et al.*, 2002).

Actualmente, existe una preocupación por parte de los consumidores por el contenido graso de los alimentos debido a las evidencias clínicas y epidemiológicas que indican que las dietas excesivamente ricas en grasas saturadas y colesterol son perjudiciales

para de la salud, debido a su asociación con la obesidad y enfermedades cardiovasculares. Por contra, los lípidos más insaturados y de larga longitud de cadena, como los presentes en productos marinos, parecen jugar un papel relevante en la prevención de diferentes patologías como las enfermedades coronarias. Durante las últimas décadas, se han logrado avances científicos notables en nuestra comprensión de cómo los lípidos de la dieta influyen en la salud humana, lo que ha conducido a constatar que es importante diferenciar los aceites y grasas alimentarias y su composición en las diferentes clases de lípidos así como ácidos grasos, con efectos beneficiosos en la salud más allá de las funciones metabólicas que desempeñan en el organismo (Chow *et al.*, 2007; Nagao *et al.*, 2008 Rizos *et al.*, 2013).

1.1. Lípidos polares

Los lípidos polares (LP) se caracterizan por ser moléculas anfipáticas en las que se distingue una región hidrófoba (apolar) y una región hidrófila (polar). Además de tener la estructura básica formada por átomos de carbono, hidrógeno y oxígeno, como en el caso de los glicéridos (apolares), se componen de fracciones que les aportan polaridad e incluso, en algunos casos, carga eléctrica, pudiendo contener fósforo, azufre o nitrógeno. Entre otros LP, encontramos los GFL y los SL.

1.1.2. Estructura y función de los lípidos polares

Los GFL están compuestos por una molécula de alcohol (glicerol) a la que se une un grupo fosfato, conformando la región polar y dos ácidos grasos en las posiciones *sn-1* y *sn-2* (región apolar). El grupo fosfato, mediante enlace fosfodiéster, se une a un alcohol que dará el nombre del GFL en función de si es colina (fosfatidilcolina, FC), etanolamina (fosfatidiletanolamina, FE), inositol (fosfatidilinositol, FI) o serina (fosfatidilserina, FS) (Vance y Vance, 2008) (Figura 1.1). En el caso de los SL, el alcohol esfingosina se une a un ácido graso de la molécula mediante enlace amida, siendo la esfingomielina (EM) el SL más representativo (Figura 1.1).

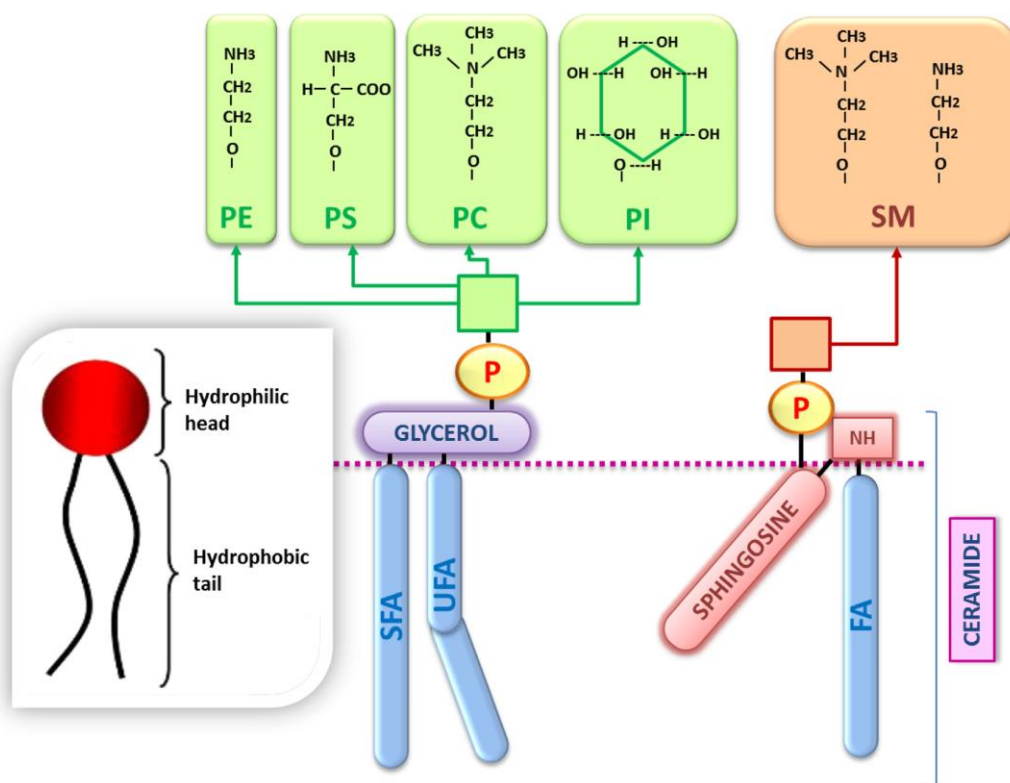


Figura 1.1. Estructura química de los glicerofosfolípidos y la esfingomielina (Castro-Gómez *et al.* 2015a)

Destaca de los LP su amplia distribución en todos los tejidos, ya sean animales o vegetales. Entre otras, se puede destacar su función estructural, conformando la base principal de las membranas celulares debido a su capacidad anfipática, lo que permite la interacción entre el esqueleto hidrofóbico del LP y la interacción hidrofílica de la cabeza polar con las moléculas del entorno, formando así la bicapa lipídica. De este modo, esta bicapa separa los compartimentos acuosos del medio. Además de su función estructural, los LP son moléculas de señalización celular o precursores de éstas, forman parte de las lipoproteínas y de la bilis, principalmente la FC, y están implicados en el anclaje de proteínas a la membrana plasmática (FE, FS). La FC es el GFL más abundante de las membranas, tanto animales como vegetales, encontrándose principalmente en la cara externa, además, forma parte de las lipoproteínas plasmáticas y participa en procesos de señalización celular al ser fuente de 1,2-diacylglicerol (1,2-DG) por acción de la fosfolipasa D. Por otro lado, la dipalmitoil-FC forma parte del surfactante pulmonar y contribuye a mantener la integridad alveolar. En la parte interna de la bicapa lipídica se encuentra la FE en un 20-30%; su posición y estructura, facilitan la transición de las proteínas de membrana desde el citoplasma a la membrana plasmática (Vance y Vance, 2008). Otro GFL

situado principalmente en la parte interna de la bicapa es la FS, la cual contribuye a las interacciones electrostáticas no específicas. Sin embargo, cuando la FS está localizada en la parte externa, forma parte de procesos de activación de plaquetas o apoptosis, actuando como una molécula señalizadora y también como intermediaria en la señalización celular al ser necesaria para la activación de la proteína kinasa C, enzima clave en la transducción de numerosas respuestas celulares (Mozzi *et al*, 2003; Leventis y Grinstein, 2010). Otro GFL implicado en rutas de señalización celular es el FI, situado también en la parte interna de la membrana lipídica. Se encuentra principalmente en forma de 1-estearoil-2-araquidonoil, siendo así la fuente principal del ácido araquidónico (AA) en la síntesis de eicosanoides, moléculas de señalización. Además, determinadas lisoformas de los GFL, que son las moléculas que se generan tras la pérdida de uno de los AG de los GFL, participan en procesos de señalización celular. Así, para la liso-FE, se han descrito varias propiedades biológicas en tejidos animales *in vitro* (Arouri y Mouritsen, 2013). El liso-FI participa en la remodelación de la composición de los AG y actúa como biomarcador en pacientes de cáncer (Yamashita *et al*, 2013). La liso-FS interviene como señalizador celular en la activación de neutrófilos, además de ejercer una acción antiinflamatoria (Frasch y Bratton, 2012). Por último, la liso-FC actúa también como señalizador celular aportando efectos beneficiosos en la artritis reumatoide y desempeña un papel importante en la metilación de las células del sistema nervioso (Arouri y Mouritsen, 2013; Sevastou *et al.*, 2013). En cuanto a la EM, se encuentra en la parte externa de la bicapa lipídica de las membranas animales y destaca su abundancia en la vaina de mielina que rodea los axones de células nerviosas cuya función parece ser mejorar el aislamiento de las fibras nerviosas. Cabe destacar los microdominios de la membrana ricos en EM y colesterol, llamados *rafts*, que provocan una fluidez alterada y gran número de funciones celulares como la homeostasis del colesterol, respuesta a patógenos o transducción de señales (Aureli *et al.*, 2011; Merril, 2011).

1.1.3. Presencia y función de los lípidos polares en los alimentos

Además de las rutas metabólicas de síntesis de LP, un amplio rango de alimentos de nuestra dieta, aportan diferentes tipos y cantidades de LP. Se estima que una ingesta media diaria aporta en torno a 2-8 g de LP. Entre los alimentos en los que destaca su presencia, se encuentran los huevos, vísceras y carnes magras, pescado y crustáceos, cereales y semillas oleaginosas, leche y derivados lácteos (Tabla 1.1). El GFL más representativo en los alimentos es la FC, encontrándose FE, FI y FS en menores

cantidades. Por otro lado, en carne y pescado destaca la EM, para la cual se estima un consumo diario de 0,3-0,4 g. En cuanto a productos de origen vegetal, la soja contiene un porcentaje del 4% de LP sobre el peso graso total, donde más de la mitad es FC (55%), seguido de FE (26%) y FI (18%). El consumo de LP se incrementa en algunos alimentos debido a la presencia de lecitina (que contiene principalmente FC, aunque también contiene en menor cantidad FE y FI), empleada habitualmente como aditivo alimentario por su poder emulsionante en margarinas, chocolates, leches en polvo, productos de panadería, etc. (Cohn, 2010). En este sentido, son los alimentos de origen animal los que presentan mayores contenidos de LP (Tabla 1.1). El alimento más extensamente estudiado ha sido la yema de huevo, que contiene aproximadamente un 10% de LP en peso total, donde la FC es el mayoritario con un 60-70% sobre el total de LP, seguido por FE, EM y liso-FC con un 15-26%, 2.5-5% y 6-8% respectivamente (Waldemar, 2002). Entre las carnes de consumo habitual, la ternera contiene aproximadamente un 1 % de LP que se distribuyen entre FE, FC y EM con valores alrededor de 31%, 62% y 7 % respectivamente, mientras que FI y FS son muy bajos o inexistentes. La pechuga de pollo presenta un contenido en LP de 4% con un 14% de FS sobre el total de lípidos (Cohn *et al.*, 2010). Pero son las vísceras de animales las fuentes más ricas en LP, como es el caso del hígado y cerebro, donde además se presentan todos los LP en su composición. Sin embargo, el consumo de estos productos está muy restringido y regulado debido a que son una posible fuente de transmisión de encefalopatía espongiforme. La leche y productos lácteos son la fuente alimentaria que proporciona todos los LP de una forma segura, aunque su contenido no es muy elevado, alcanzando entre el 0,3-1% del total de grasa del producto. Sin embargo, algunos productos lácteos como mazada (Mz) y en especial la fracción de membrana del glóbulo graso lácteo (MGGL), contienen LP en importantes concentraciones de hasta de un 40% en peso sobre el total de grasa, donde la FE es aproximadamente el 30%, 7% de FI, 5% FS, 31% FC y 20% de EM sobre el total de LP (Fong *et al.*, 2007; Rodríguez-Alcalá y Fontecha, 2010). Sin embargo, en la actualidad, debido a la tendencia del consumo de productos lácteos con bajo contenido en grasa, el consumo de LP en la dieta está disminuyendo.

Tabla 1.1. Lípidos totales y contenido en LP en alimentos (Cohn *et al.*, 2010)

	grasa total (g/100g alimento)	(mg/100g)						
		Total LP	FC	FE	FI	FS	EM	lisoFC
Yema de huevo	32	10.306	6.771	1.917	64	-	486	419
Hígado de cerdo	4	2.901	1.688	618	209	38	131	61
Hígado de pollo	6	2.542	1.120	829	-	146	291	-
Soja	21	2.308	917	536	287	-	-	-
Calamar	2	1.098	777	114	-	83	102	-
Pechuga de pollo	1	782	391	187	-	100	56	-
Vacuno	4	660	407	207	-	-	46	-
Cacahuetes	49	620	270	50	150	-	-	-
Bacalao	2	580	331	128	23	29	29	6
Espinaca	0	157	37	36	11	-	-	-
Patata	0	76	38	22	12	1	-	-
Zanahoria	0	55	23	15	5	3	-	-
Manzana	0	40	21	10	6	1	-	-
Leche de vaca	4	34	12	10	2	1	9	-

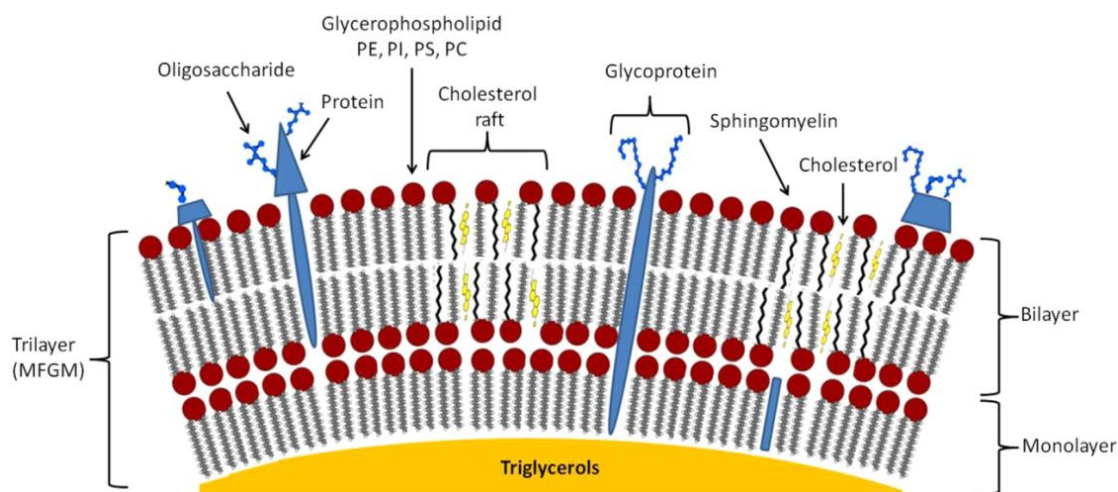
2. LECHE Y PRODUCTOS LÁCTEOS COMO FUENTE DE LÍPIDOS POLARES

Como se ha mencionado anteriormente, la leche y sus productos derivados contienen LP, aunque con contenido muy variable en función del derivado lácteo (Tabla 1.2). Así, mientras que la leche entera puede tener en torno a 0.2-1g LP/100 g de grasa, la mazada (Mz) contiene alrededor de 5-30 g LP/100 g grasa (Pimentel *et al.*, 2016).

Cabe destacar que en la leche, la grasa se encuentra en forma de pequeñas gotas esféricas o glóbulos, estabilizados en emulsión. Estos glóbulos tienen un diámetro entre 0.2-15 μm , con un tamaño medio de 4 μm . Este tamaño varía en función de la raza, estado de lactación de la vaca, etc. Estos glóbulos de grasa se forman en las células de la glándula mamaria. Los TG son sintetizados en el retículo endoplasmático y acumulados en el citoplasma en forma de gotas lipídicas. Estas gotas lipídicas intracelulares, son rodeadas por una capa compuesta por GFL, SL, Col y proteínas (Evers *et al.*, 2008). Las gotas lipídicas van incrementando su tamaño por la fusión con otras y son transportadas hasta la zona apical de la célula hasta ser secretadas. En la secreción, las gotas lipídicas son recubiertas por la membrana plasmática externa. De este modo, la membrana del glóbulo lipídico dispone de tres capas lipídicas, y es conocida como MGGL (Figura 1.2).

Tabla 1.2. Contenido en GFL de diferentes productos lácteos (Pimentel *et al.*, 2016)

Producto	Lípidos polares	
	(mg/ 100 g producto)	(g/ 100 g grasa)
Leche de oveja	30	0,4
Leche de cabra	28	0,7
Leche de vaca	29-40	0,7-1
Leche desnatada	20-82	11-19
Nata	139-190	0,3-1
Mantequilla	70-230	0,1-0,3
<i>Butteroil</i>	10	0,10
Mazada	1-160	4-33
Mazada (desnatada)	110	20
Suero de mantequilla (entero)	97	40
Suero de mantequilla (desnatado)	93	49
Yogur desnatado	18	5
Queso fresco	310	1
Cuajada (desnatada)	32	25
Cuajada	58	1

Figura 1.2. Estructura de la MGGL (Castro-Gómez *et al.*, 2015a).

La membrana evita la floculación de los glóbulos grasos en la leche y protege a la grasa de la acción de las enzimas del entorno (Danthine *et al.*, 2000). La MGGL tiene una destacable importancia, estudiada en numerosas investigaciones recientes debido a su potencial capacidad como ingrediente funcional. No obstante, hay que tener en cuenta el tratamiento al que es sometida la leche, así como los derivados lácteos, y la repercusión que puede implicar en tales propiedades. En cuanto a su composición, LP

y proteínas forman el 90% del total de su peso seco de la MGGL, pero la proporción entre éstos puede variar. Glicoproteínas, TG, Col y enzimas, son otros componentes minoritarios que la conforman. Respecto a la fracción lipídica, la clase lipídica más representativa en la MGGL son los TG en, aproximadamente, un 60% de lípidos totales, seguidos de un 30% de LP (Vanderghem *et al.*, 2010) (Tabla 1.3); sin embargo, cabe destacar que el alto contenido en TG de la MGGL es, mayoritariamente, debido a la contaminación por parte del núcleo del glóbulo graso hacia la membrana. El Col es el representante de los esteroides que componen la MGGL, alcanzando un 90% de los esteroides totales. Además, también encontramos en su composición mono- y diglicéridos (MG, DG) y ácidos grasos libres (AGL) de manera minoritaria (Jensen, 2002; Calvo *et al.*, 2014).

Tabla 1.3. Composición lipídica de la MGGL de leche (Singh, 2006).

Composición lipídica de la MGGL	
Clase lipídica	% lípidos totales
Triglicéridos	62
Diglicéridos	9
Esteroides	0,2-2
Ácidos grasos libres	0,6-6
Fosfolípidos*	26-31
Esingomielina	22
Fosfatidilcolina	36
Fosfatidiletanolamina	27
Fosfatidilinositol	11
Fosfatidilserina	4
Liso- fosfatidilcolina	2
*distribución de fosfolípido en % total de fosfolípidos	

2.1. Mazada como fuente de lípidos polares

Debido a su composición, la MGGL, es considerada como un ingrediente alimentario tanto a nivel tecnológico por sus propiedades emulsificantes, como a nivel bioactivo por sus propiedades funcionales (Dewettinck *et al.*, 2008; El-Loly 2011, Contarini y Povo, 2013). Así, a lo largo de los años se han desarrollado diferentes métodos de separación para su empleo. En este sentido, la Mz es considerada una fuente idónea para el aislamiento de MGGL a escala industrial debido a su bajo coste, al tratarse de

un subproducto producido en la elaboración de mantequilla, además de su contenido relativamente alto en MGGL y, por tanto, en LP. La Mz puede ser obtenida mediante fermentación de la nata (Mz fermentada) o por el batido de la nata para la obtención de mantequilla, paso en el que se obtiene una fracción acuosa (Mz dulce), separada de la grasa (mantequilla). Esta separación se produce por un mecanismo físico de ruptura de la emulsión inicial de la nata (aceite en agua) debido al contacto del aire y las colisiones, lo que provoca la desestabilización de la MGGL dando lugar a la coalescencia de los glóbulos grasos hasta conseguir una fase sólida (mantequilla), separada de la líquida (Mz), que será desplazada simplemente por drenaje (Figura 1.3.).

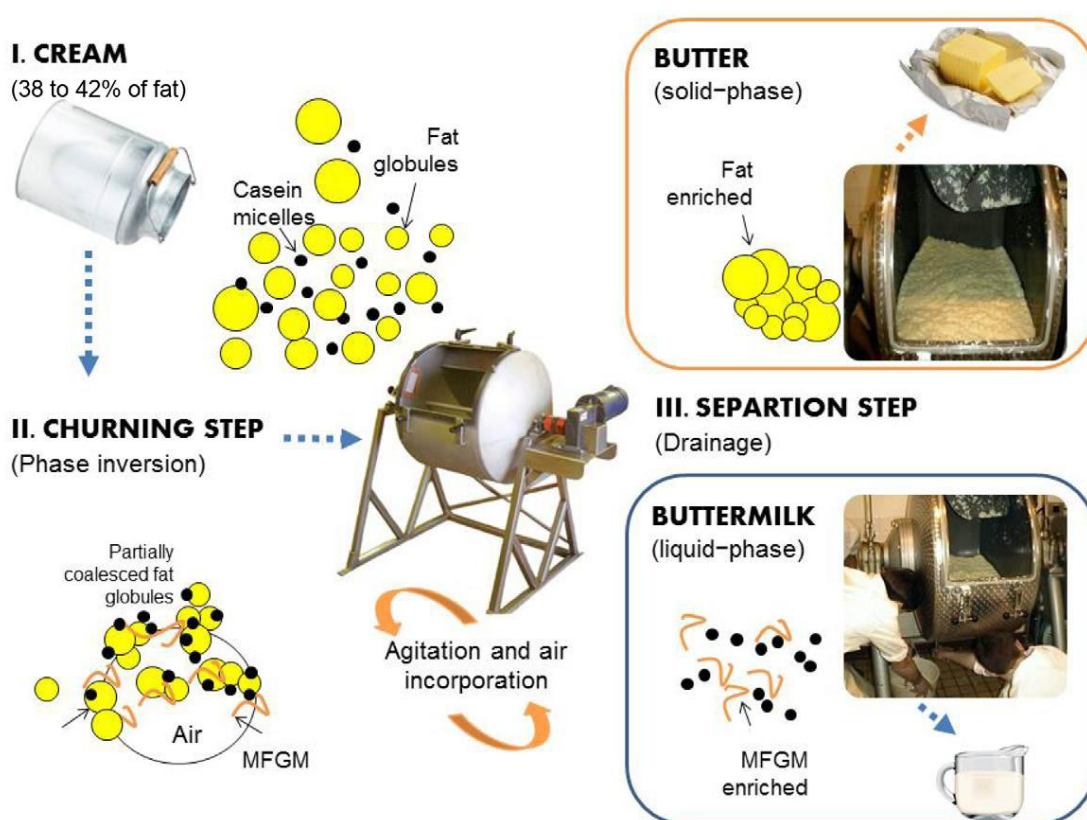


Figura 1.3. Paso I: Nata, Paso II: Batido de la nata, Paso III: Separación de mantequilla (butter), enriquecida en grasa, de la mazada (buttermilk), fase acuosa enriquecida en MGGL (Conway *et al.*, 2014).

En cuanto a su composición global, es muy similar a la leche desnatada. Más del 80% de sus proteínas se encuentran principalmente en la leche (caseínas y proteínas del suero) (Conway *et al.*, 2014). Sin embargo, la composición de la fracción lipídica difiere de manera notoria, ya que la cantidad de los LP varía en función del producto lácteo y

su contenido y distribución lipídica. Contarini y Povolo (2013), reportaron valores de un 0.9% de LP (g de LP/100g grasa) en nata; este valor se ve incrementado con un contenido de un 4.5% de LP en la grasa total de Mz, y disminuye a 0.2% de LP en la grasa total de mantequilla debido a la diferente distribución de la MGGL en los productos obtenidos en el batido de la nata.

3. FUENTES MARINAS DE LÍPIDOS POLARES

El aporte en LP de fuentes marinas puede variar en un amplio rango en función del organismo. Así, por ejemplo, en pescado se encuentra entre un 1%-1.5% LP en su composición total (Hjaltason y Haraldsson, 2006), pero este valor se incrementa hasta un 27% en huevos de salmón. Sin embargo, aunque el aporte de LP de organismos marinos varía ampliamente, cuentan con la particularidad de llevar incorporados en su estructura AGPICL n-3 (Burri *et al*, 2012). En la Tabla 1.4., se muestra la composición en AGPICL n-3 de productos marinos, que proporcionan un importante aporte en estos AG respecto a otras fuentes alimentarias.

Tabla 1.4. Composición en AG n-3 y AG n-6 de productos marinos (g AG/ 100 g alimento) (Sioen *et al.*, 2006).

Alimento	AL	AAL	AA	EPA	DPA	DHA	Σn-6	Σn-3
Pescados grasos	0,4	0,6	5,0	47,4	49,8	48,1	0,4	7,3
Derivados de pescado	0,4	0,1	0,4	3,2	1,9	3,0	0,4	0,5
Pescados semi-grasos	-	0,0	1,2	5,2	3,8	6,6	0,0	0,8
Pescados magros	0,0	0,0	2,2	7,6	4,5	9,5	0,0	1,2
Moluscos y crustáceos	0,0	0,1	8,9	23,9	6,1	12,9	0,1	2,3

AL: ácido linoleico, AAL: ácido alpha-linolénico, EPA: eicosapentaenoico, DPA: docosapentaenoico, DHA: docosahexaenoico.

Los AGPICL n-3, sintetizados a partir del ácido alpha-linolénico (AAL), participan en numerosas funciones biológicas en el organismo, como la síntesis de eicosanoides, moléculas lipídicas originadas por la oxidación de ácidos grasos de 20 átomos de C agrupados en prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos (Riediger *et al*, 2009). Los eicosanoides desarrollan numerosas funciones relacionadas con el sistema nervioso central, mecanismos de inflamación y respuesta inmune. Un ejemplo de ello, es la acción antiinflamatoria que ejercen los AG eicosapentaenoico (20:5 n-3, EPA) y docosahexaenoico (22:6 n-3, DHA), al administrarse de manera suplementada, ya que provocan el desplazamiento del AA (20:4 n-6) de los LP de las membranas, que desempeña el papel de precursor de eicosanoides implicados en procesos

proinflamatorios (Simopoulos, 2009). En este sentido, es fundamental el balance de los AGPI n-6/ n-3 de la dieta, siendo el ácido linoleico (AL) precursor metabólico de compuestos n-6, como el AA, y el ácido linolénico (AAL), precursor de los AGPICL n-3 (como EPA y DHA). Las dos familias de AG, n-6 y n-3, emplean las mismas enzimas para la síntesis de eicosanoides, involucrados como mediadores en el sistema nervioso central, eventos de inflamación y respuesta inmune, con funciones proinflamatorias en el caso de los n-6 y antiinflamatorias en los eicosanoides derivados de los AG n-3, por lo que un balance desregulado entre AG n-6 y AG n-3, podría desembocar en el desarrollo de enfermedades (Hibbeln *et al.*, 2006). De este modo, la importancia de los LP procedentes de fuentes marinas, reside en el aporte de los AGPICL n-3 incorporados en su molécula. Los productos de origen marino como el calamar, huevos de pescado, o el krill, proporcionan un alto contenido en LP, con más del 50% sobre el total de grasa, aportando mayoritariamente FC (87.5% sobre el total de LP), seguido de FE (5.8%), EM (3.4%) y FI (2.2%) como describen Kullenberg *et al.* (2012) y Castro-Gómez *et al.* (2015b). La elevada cantidad de n-3 como el EPA y DHA esterificados en LP, parece otorgar mayor biodisponibilidad a estos AG que cuando están esterificados en TG (Ulven *et al.*, 2011).

3.1. Aceite de krill como fuente de lípidos polares

La fuente de LP marinos predominante, según Burri y Berge (2013), es el aceite de krill (AK). La composición lipídica del AK, rica en AGPICL n-3 así como en LP, ha sido ampliamente estudiada. El krill es un crustáceo marino de pequeño tamaño que se encuentra principalmente en el océano Antártico (*Euphausia superba*). El hecho de ser el mayor representante de la biomasa del zooplancton antártico, con una estimación de entre 125-750 millones de toneladas métricas, de acuerdo con la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, hace factible su atractivo para su comercialización como ingrediente con alto valor biológico debido a su composición lipídica.

El contenido en AK puede variar desde un 12% hasta un 15% en peso seco. En su composición lipídica posee una cantidad de EPA y DHA similar a los aceites de pescado, sin embargo la característica que resalta la importancia del AK se debe a que en composición, aproximadamente el 40% de los AGPICL n-3 se encuentran como LP (Ulven *et al.*, 2011, Castro Gómez *et al.*, 2015b). Además, tiene un elevado contenido del carotenoide astaxantina en su fracción oleosa, procedente de las algas y plancton del que se alimenta y cuyo poder antioxidante es superior al de las vitaminas

A y E (Suzuki y Shibata, 1990). Este compuesto, jugaría un importante papel en la estabilidad del AK debido a su elevado porcentaje de AGPI. Los AGPICL n-3, en el caso de los aceites de pescado, se encuentran fundamentalmente esterificados en TG, sin embargo, en el AK una importante fracción de estos AG se encuentra formando parte de los LP que contiene, principalmente FC. Castro-Gómez *et al* (2015b) analizaron las clases lipídicas que contiene el AK separadas en función de su grado de polaridad. Aislaron una fracción apolar, EC y TG, una fracción de polaridad intermedia, DG, AGL+Col y MG y una tercera fracción compuesta principalmente por FC. En el análisis, observaron que en EC y TG, la composición en EPA y DHA era de un 3.5% y un 1.16% respectivamente, mientras que la FC contenía un 27.2% y un 10.3% respectivamente. Esta distribución de EPA y DHA en AK, ha dado lugar a numerosos estudios que han confirmado una mayor efectividad de los AGPICL n3 en el organismo cuando se encuentran en forma de LP debido a una mejor absorción y asimilación en los tejidos, especialmente en cerebro (Ghasemifard *et al.*, 2015; Di Marzo *et al.*, 2010). Además, se ha observado un incremento de los niveles plasmáticos de EPA y DHA con la administración de AK respecto al consumo de aceites de pescado (Maki *et al* 2009, Schuchardt *et al* 2011).

4. EFECTOS BENEFICIOSOS DE LÍPIDOS POLARES Y ACIDOS GRASOS n-3 DE AL DIETA

Como ya se ha mencionado anteriormente, los beneficios para la salud por el consumo de los LP y AGPICL n-3, han sido investigados en numerosas publicaciones, por lo que cabe mencionar la importancia estos compuestos lipídicos en los alimentos. Se han asociado con beneficios en enfermedades cardiovasculares, inflamatorias, determinados tipos de cáncer y deterioro cognitivo (Kullenberg *et al.*, 2012). Algunas de estas funciones están muy relacionadas con los compuestos generados en el metabolismo de los LP, por ejemplo, en el caso de la EM, las ceramidas y la esfingosina-1-P, son mensajeros implicados en el crecimiento y proliferación celular, apoptosis, angiogénesis, así como en funciones inmunológicas (Berra *et al.*, 2002; Schmelz *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2008). Por otro lado, ha sido investigado cómo la ingesta de LP puede modificar la composición en ácidos grasos de la membrana de determinados tipos de células, lo que se traduce en la modulación de sus funciones celulares así como la actividad de enzimas ancladas a la membrana (Contarini y Povolito, 2013). Cabe mencionar las diferentes moléculas de SL que se pueden encontrar en función del tipo de alimento; así, en alimentos de origen vegetal, priman los cerebrósidos, sin embargo en alimentos de origen animal, como es el caso de la

MGGL, la EM es el SL predominante, con un valor biológico ampliamente estudiado (Kullenberg *et al.*, 2012).

4.1. Efecto en enfermedades cardiovasculares

Respecto a los efectos producidos por el consumo de LP en enfermedades cardiovasculares (ECV), han sido varios los estudios que han demostrado recientemente que el incremento del consumo de productos lácteos está asociado con la reducción de incidencia de obesidad, resistencia a la insulina, dislipemia o diabetes tipo II (factores de riesgo ECV) (Kratz *et al.*, 2013; Spitsberg, 2005). Un estudio realizado por Wat *et al.* (2009), emplea un derivado lácteo rico en LP en la dieta de ratones donde se observa que la suplementación de LP en dieta rica en grasa provoca una disminución significativa en el nivel de lípidos séricos sus lípidos totales, TG y Col, así como en el peso del hígado. Se han observado efectos similares con la administración de una dieta suplementada en Mz, produciendo la mejora en el perfil lipídico en plasma de ratas jóvenes (Oosting *et al.*, 2012), así como la disminución de la concentración de Col en plasma con la ingesta de Mz en humanos, donde se sugiere que este efecto es debido a su menor absorción intestinal (Conway *et al.*, 2014). La absorción del Col de la dieta, depende en gran parte de la concentración y naturaleza de los LP presentes (Ros, 2009). En este sentido, la presencia de SL en el lumen, produce una menor solubilidad del Col con las micelas biliares, necesarias para su digestión, provocando así su menor absorción. Un ejemplo de esta interacción, es la formación de complejos de EM con formas moleculares de Col en el lumen a través de su unión con cadenas de ácidos grasos saturados. En esta unión, se impide la absorción de ambos compuestos (Conway *et al.*, 2014). Cabe mencionar que la menor solubilidad del colesterol relacionada con el consumo de Mz, como fuente de EM, puede verse modificada en función del procesamiento industrial al que haya sido sometida, así, Conway *et al.* (2010) observaron cómo la absorción de Col disminuía en un 57% con el consumo de Mz procedente de nata sin aplicación de tratamiento térmico, pero tan sólo disminuía un 17% cuando se suplementaba una dieta con Mz procedente de nata pasteurizada.

Reis *et al.* (2013) observaron efectos similares en roedores, donde disminuyó la concentración de TG en sangre en el grupo tratado con la suplementación de Mz. En el estudio, proponen que esta disminución podría ser atribuida a una menor síntesis hepática de TG, que estaría directamente relacionada con el incremento en LP procedentes del consumo de Mz. Por otro lado, Ohlsson *et al.* (2009) no vieron efectos

beneficiosos significativos en las concentraciones lipídicas plasmáticas con la administración de Mz enriquecida en SL. Tampoco se observaron diferencias en la absorción y síntesis de Col, ni modificaciones en el perfil lipídico sanguíneo, en un estudio aleatorizado cruzado con la administración de EM de origen lácteo (Ramprasath *et al*, 2013). Otra fuente de LP muy estudiada, en relación a las ECV, son los LP marinos. Bunea *et al* (2004) y Berge *et al* (2014) demostraron cómo el consumo de una fuente rica en LP, como es el caso del aceite de krill, mejoraba los parámetros relacionados con las ECV al disminuir Col total, Col LDL, y TG, además de incrementar el nivel de Col HDL. Sin embargo, la administración de aceite de pescado con el mismo contenido en AGPICL n3 que el AK, tan sólo redujo los niveles de TG.

Los beneficios del consumo de AG n-3 y la mejora de síntomas de riesgo de ECV, parecen estar relacionados con la modificación de los perfiles de las lipoproteínas (Berge *et al.*, 2014). En esta línea, son varios los estudios que confirman los efectos hipotrigliceridémicos plasmáticos con la suplementación de AGPICL n-3 en humanos. Así, Mori *et al.*, (2000), observaron la disminución de los niveles de TG plasmáticos en un 23% en individuos con hiperlipidemia leve tras la suplementación de 4 g/ día EPA. Este mismo efecto se produjo con la administración de DHA (1g/ día) sólo o en combinación con EPA (1.25 mg en total) (Schwellenbach *et al.*, 2006). Kris-Etheron *et al.* (2003), también confirmaron los mismos efectos con la ingesta diaria de 2 a 4 g de EPA+DHA. Por otro lado, los AG n-3, también estarían implicados en la disminución de la expresión de genes que codifican proteínas estimuladoras de la síntesis de lípidos, a la vez que aumentarían la expresión de genes implicados en la oxidación lipídica, disminuyendo así el nivel de lípidos del organismo. Además, actuarían también sobre los niveles de los quilomicrones y la lipidemia postprandial a causa de la disminución de la secreción de VLDL (Jacobson, 2008). Por otro lado, Piscitelli *et al.*, (2011) estudiaron los efectos de la suplementación de AGPICL n-3 en forma de AK en ratas con dieta alta en grasa, donde se observó un menor nivel de TG y Col en hígado, así como otros efectos positivos relacionados con el sistema endocanabinoide, implicado en el balance energético, y otros tejidos metabólicamente relevantes. Simopoulos (2009) describe los efectos de la ingestión de EPA y DHA procedente de pescado en los eicosanoides con efecto inflamatorio. Entre ellos, se encuentra la disminución de la prostaglandina 2 (PGE2), implicada en la agregación plaquetaria y tromboxano A2 (TxA2), inductor de la inflamación y de la quimiotaxis y adherencia de leucocitos. Además, producen el incremento del TxA3, que provoca una débil agregación plaquetaria y vasoconstricción, PGI3, vasodilatadora e inhibidora de la agregación plaquetaria del LeuB5, leve inductor de la inflamación, así como agente quimiotáctico.

La aterosclerosis, considerada una enfermedad inflamatoria sistémica con un proceso de desarrollo fuertemente ligado al estado e integridad de las células endoteliales, está altamente relacionada con la adecuada presencia de EPA y DHA, así como eicosanoides involucrados en la prevención de la agregación plaquetaria y disminución de la expresión de moléculas de adhesión y citoquinas proinflamatorias (Cawood *et al.*, 2010). Los radicales libres iniciarían la inactivación del óxido nítrico y PGI₂ como primer paso de la aterosclerosis. En este contexto, EPA y DHA, junto con las lipoproteínas de alta densidad (HDL), inhiben la producción de radicales libres. Además, EPA y DHA, actúan como supresores de IL6 y participan en la síntesis y secreción de moléculas antiinflamatorias endógenas como el TNF- α , hecho que se traduce en la prevención del estrés oxidativo. El papel de los AGPICL n3 en los mecanismos de inflamación del organismo es fundamental para determinar el riesgo de la mayor producción de citoquinas proinflamatorias y radicales libres cuando se encuentran de manera deficiente en las células endoteliales (Das 2006).

4.2. Efecto en cáncer

Existen numerosos estudios relacionados con el consumo de LP y su acción beneficiosa en procesos cancerígenos (Castro-Gómez *et al.*, 2015a). Principalmente, se han visto efectos beneficiosos relacionados con el cáncer de colon. Así, Snow *et al.* (2010) suplementaron a ratas con tres dietas diferentes con EM al 0.01% sobre la dieta total en aceite de maíz, leche anhidra y MGGL procedente de Mz. La administración de MGGL produjo efectos protectores contra el cáncer de colon al reducir el número de focos de criptas aberrantes (glándulas anormales que pueden conducir a cáncer). En líneas celulares de cáncer de colon SW-480, se estudió el efecto del consumo de FC de soja junto a un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (AINE), donde se produjo la inhibición de la síntesis de ADN, que se traduce por una disminución en el crecimiento celular (Dial *et al.*, 2006). Los productos de digestión de la EM, tienen gran relevancia en cuanto a procesos de proliferación, apoptosis y senescencia celular, por lo que ha sido ampliamente estudiado por su potencial efecto sobre las células cancerígenas (Kuchta *et al.*, 2012). También se observó un efecto tanto quimioterapéutico como quimioprotector en la investigación de Lemonnier *et al.* (2003), al observar una reducción del desarrollo del tumor de colon en ratones con la administración de EM antes y después de la aparición del tumor. Zanabria *et al.* (2013), observaron que en células humanas de cáncer de colon HT-29, se inducía la apoptosis con la administración de MGGL de leche. El mecanismo propuesto está

relacionado con las funciones de señalización de la EM, particularmente en crecimiento, desarrollo y diferenciación celular. En cuanto a la investigación relacionada con la determinación de la actividad antitumoral de los LP, en general, se han empleado LP de origen vegetal como la soja, o de origen marino, como el AK o algas (El Baky *et al*, 2014; Fukunaga *et al.*, 2008; Sakakima *et al.*, 2009). Sin embargo, no existen muchos trabajos donde se haya evaluado el potencial papel de los LP lácteos como compuestos anticancerígenos. Si bien, como se ha citado, se ha evaluado la bioactividad de la MGGL completa, no se define con exactitud la funcionalidad de las proteínas, de los LP, o de la sinergia que se pueda establecer entre ambos componentes de la MGGL (Duan, 2005; Spitsberg 2005; Fong *et al.*, 2007). En esta línea, Castro-Gómez *et al.*, (2016), determinaron la actividad antiproliferativa de Mz completa, de su extracto lipídico, y de sus fracciones, polar y no polar (extracción con disolventes *Generalmente Reconocidos Como Seguros* -GRAS- o con disolventes orgánicos), en 9 líneas tumorales humanas. Los resultados confirmaron que el extracto total de grasa de Mz obtenido por disolventes GRAS, mostró una inhibición parcial del crecimiento celular en la línea celular de cáncer de médula/ leucemia humano (K361) a la máxima concentración ensayada, así como la fracción polar extraída con disolventes GRAS, inhibió el crecimiento de las líneas tumorales ADR/RES (ovario con resistencia a múltiples fármacos) y de las líneas tumorales HT29 (cáncer de colon). Por otro lado, cabe mencionar que aunque hay numerosos estudios *in vitro* e *in vivo* relacionados con la actividad antiproliferativa, no se han encontrado evidencias clínicas en humanos del efecto del consumo de Mz y su relación en los efectos beneficiosos en procesos cancerígenos.

4.3. Efecto en enfermedades hepáticas

En la literatura descrita se han encontrado numerosos estudios de los efectos beneficiosos de los LP en relación con enfermedades hepáticas. En concreto, destaca la acción de la FC como agente protector frente a la enfermedad hepática inducida por alcohol (Gundermann *et al.*, 2011). En el caso de enfermedades no relacionadas con el consumo de alcohol, se ha descrito que la actividad antioxidante y antiinflamatoria de la FC, con una dosis de 100mg/día, toma parte en la mejora de casos con daño hepático provocado por isquemia en ratas (Demirbilek *et al*, 2006), así como en numerosos estudios donde se evalúa la mejora de hepatitis C con la aplicación de antioxidantes de la dieta *in vitro* e *in vivo*, entre los que se encuentra la FC (Singal *et al.*, 2011). En relación con las enfermedades causadas por un consumo excesivo en alcohol, ha sido señalada la implicación de la FC de la dieta con la disminución de

daños hepáticos por producir una menor acumulación de TG y ésteres de colesterol (EC) que se liberan en el hígado debido al consumo de alcohol. Por otro lado, Buang *et al* (2005) observaron la disminución de la oxidación celular con el consumo de FC (Lieber, 2005) y señalan que este efecto vendría provocado principalmente por la molécula de FC sin ser tan determinantes los AG presentes en ésta. En otro estudio realizado por Tandy *et al.*, (2009), observaron en ratones con dieta alta en grasa, que con una suplementación de un 5% AK en la dieta, mostraba diferencias significativas en la disminución de TG y Col hepáticos respecto a la dieta alta en grasa sin suplementación, los cuales, presentaron esteatosis hepática derivada de un incremento de TG y Col en hígado. En otro estudio similar, se observaron los mismos efectos positivos con la suplementación de 2.5% AK en ratas que consumían una dieta alta en grasa, reportando una menor acumulación de TG y Col en hígado, así como una reducción en los niveles plasmáticos de TG y glucosa (Ferramosca *et al.*, 2012). Por otro lado, Burri *et al.* (2011) concluyeron que el aporte de la misma cantidad de AGPICL n-3 en aceite de pescado o en AK en ratas, sólo produjeron efectos beneficiosos con la suplementación de AK, que provocó una menor actividad de las rutas metabólicas envueltas en la síntesis de glucosa, lípidos y Col; así como una mayor actividad de la cadena respiratoria mitocondrial.

4.4. Efecto en enfermedades bacterianas y respuesta inmunitaria

Varios estudios han señalado la capacidad antimicrobiana de los SL de la MGGL frente a bacterias transmitidas por los alimentos que producen gastroenteritis, como son *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes* y *Clostridium perfringens* (Sprong *et al.*, 2001, 2012). En un estudio con ratas alimentadas con Mz en polvo, se observó cómo la colonización de *L. monocytogenes* disminuyó respecto a ratas con la misma bacteria y con una alimentación suplementada en leche desnatada (pobre en lípidos de membrana) (German *et al.*, 2006). En este sentido, se ha demostrado desde hace décadas el efecto de la administración de FL como FC y FS en ratas que ejerce un efecto protector frente a la traslocación de bacterias entéricas y la disminución de la mucosa intestinal (Wang *et al.*, 1994), además de reducir la capacidad infectiva de los virus *in vitro* (Sinibaldi *et al.*, 1992). En el trabajo de Fuller *et al.* (2013) se estudió la acción anti-infecciosa de MGGL obtenida por microfiltración a partir de Mz, y, por otro lado, de lactosuero de nata. Ambas MGGL mostraron efectividad en la inhibición de rotavirus en células de riñón de mono, donde se observó un mayor efecto por parte de la MGGL procedente de Mz. Este mayor efecto, se le atribuyó a los lípidos de la MGGL, que se

encontraban en mayor proporción en Mz que en nata de lactosuero. Por otro lado, en un estudio clínico llevado a cabo en niños con cuadros habituales de infección (fiebre, diarrea, etc), se les suministró leche enriquecida en FL (500mg/ dosis diaria) en el grupo de intervención durante cuatro meses, mostrando la disminución de episodios febriles respecto al grupo control (Veereman-Wauters *et al*, 2012). Aunque no se especifica el mecanismo de acción, los autores concluyeron que una dieta suplementada en FL puede derivar en la mejora de sistema inmunitario, así como en las funciones del sistema nervioso central. Se ha observado una relación positiva entre la cantidad de LP de la membrana de los linfocitos y la funcionalidad de éstos para potenciar el sistema inmune (Miranda *et al.*, 2008), así, se ha descrito que con el paso del tiempo, estos LP se van perdiendo, hecho que se ha constatado al observarse un aumento constante de la relación Col/LP de las membranas celulares (Maczek *et al.*, 1998). Este hecho se traduce en la pérdida de la eficacia en la inmunoprotección. En este sentido, en el estudio realizado por Robertson *et al.*, (2014), la suplementación de AK en ratas obtuvo un aumento del número de leucocitos mayor que con la administración de aceite de pescado, debido al elevado contenido en FC del AK. Por otro lado, un estudio llevado a cabo por Da Boit *et al.*, (2015), empleó la suplementación en humanos de 2g/ día de AK como fuente de EPA y DHA durante dos semanas, con el fin de evaluar su efecto en marcadores del sistema inmune tras el ejercicio. Los resultados mostraron un incremento en la actividad citotóxica de células *natural killer* (NK), y PBMC IL-2, ambos, componentes críticos del sistema inmune, en el grupo suplementado con AK, aunque no mostraron efectos significativos en otros marcadores plasmáticos, como otras interleuquinas (IL). Por otro lado, se han realizado numerosos estudios que confirman la mejora de la artritis reumatoide, enfermedad autoinmune caracterizada por la inflamación crónica de articulaciones y huesos, con la suplementación de AGPICL n-3 (Dawczynski *et al.*, 2011, Miles *et al.*, 2012). Esta enfermedad está estrechamente relacionada con el AA como precursor de eicosanoides proinflamatorios. En este contexto, los AGPICL n-3, están implicados en la mejora de esta enfermedad al provocar la disminución de AA (n-6), así como una menor síntesis de eicosanoides sintetizados a partir de AA. En un estudio en el que se empleó la suplementación de aceite de pescado y AK, como fuente de AGPICL n-3 en un modelo de ratones con artritis inducida, se observó un inicio de la enfermedad más lento, menor inflamación en las patas y una disminución en la patología de la articulación de la rodilla con ambas suplementaciones, aunque los efectos fueron más beneficiosos con la administración del AK (Miles *et al.*, 2012).

4.5. Efecto de los lípidos polares y ácidos grasos n-3 a nivel cognitivo

Como se ha indicado, el metabolismo lipídico juega un papel fundamental en la señalización celular y fisiología de los tejidos. En particular, el sistema nervioso es el segundo órgano con mayor concentración en lípidos, por lo que se relaciona con trastornos como isquemia cerebral, esquizofrenia, bipolaridad, enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, Parkinson o Niemann-Pick cuando se encuentran alterados metabólicamente (Wibbrand *et al.*, 2013; Astarita *et al.*, 2011; Mielke y Lyketsos, 2010).

La isquemia cerebral es una enfermedad que afecta a la vascularidad del cerebro, en la que se produce la interrupción del suministro de sangre al mismo. En esta línea, se ha reportado que el DHA juega un papel fundamental para mantener una correcta integridad y funcionalidad en las membranas neuronales, preservar la neuroseñalización y disminuir la muerte neuronal (Valenzuela *et al.*, 2013). En especial, el efecto neuroprotector vendría dado por la neuroprotectina D-1 (NPD-1), compuesto cuyo precursor es el DHA (Belayev *et al.*, 2010). Son varios los estudios que confirman un menor riesgo de padecer esta enfermedad con un alto consumo de pescados (principalmente grasos) (Fotuhi *et al.*, 2009). Actualmente, está muy asentada la relación de las enfermedades neurodegenerativas con la producción del estrés oxidativo, que genera la peroxidación lipídica de los AGPICL de las membranas neuronales. Un importante ejemplo del deterioro cognitivo es la enfermedad del Alzheimer (EA), caracterizada por la pérdida de memoria a corto plazo así como de capacidades cognitivas superiores a medida que se produce la muerte neuronal. En este contexto, el papel del DHA, principalmente por la NPD-1, se ha visto fundamental por los beneficios que tendría sobre la EA por su capacidad para disminuir la generación de citoquinas proinflamatorias y el péptido β -amiloide, compuesto neurotóxico que altera la sinaptogénesis y promueve la apoptosis neuronal (Valenzuela *et al.*, 2013). En el trabajo de Lee *et al.*, (2013), se realizó un ensayo clínico con 18 personas de edad avanzada con deterioro cognitivo leve (DCL) (estado intermedio que se considera entre un envejecimiento normal y demencia), en el que consumieron un suplemento de DHA (de aceite de pescado) durante 12 meses y observaron mejoras en la memoria a corto plazo, memoria verbal inmediata y memoria diferida, con respecto al grupo que consumió un placebo. En otro estudio aleatorizado en 3 brazos, con 50 personas mayores de 65 años con DCL que consumieron durante 6 meses, un suplemento rico en EPA, en DHA o en AL (n-6), el grupo que consumió el suplemento de DHA presentó la mejor puntuación en la "Geriatric Depression Scale (GDS)" y además una mejoría en la fluidez verbal (Sinn *et*

al., 2012). Un estudio en el que se evaluó la ingesta de AGPICL de AK o aceite de sardina en ancianos sanos durante 3 meses, concluyó que la capacidad cognitiva era mejorada, e incluso se obtuvieron mayores efectos positivos cuando los AG n-3 procedían de AK al encontrarse principalmente en FC en lugar de en TG (Konagai *et al* 2013), hecho que se traduce en una mayor absorción de DHA por ir vehiculizado en una molécula de LP (Lagarde *et al*, 2011). Si bien, cabe mencionar los beneficios de los LP a nivel cognitivo, no sólo por ser buenos vehículos de AGPICL. En esta línea, la FS y EM tienen una importancia particular. Araujo *et al.* (2008), observaron un incremento de la memoria de manera prolongada en perros sabuesos viejos con la suplementación de un nutraceútico comercial compuesto por FS de soja, *Ginkgo biloba*, vit E y piridoxina. Un efecto similar se obtuvo con la suplementación oral de FS procedente de la transfosfatidilación de lecitina de soja en ratas viejas. Las ratas suplementadas mejoraron su capacidad en el test del laberinto de agua Morris. Efectos similares fueron observados por Lee *et al.* (2015) con FS derivada de la transfosfatidilación de lecitina de calamar (alto contenido en DHA). En un estudio realizado en paralelo tanto en humanos como en ratas, ambos con EA como característica común, los pacientes del grupo suplementado con 300 mg de FS/ día durante 20 semanas, mejoraron la capacidad de relacionar imágenes con vocabulario. En cuanto a las ratas con EA, el grupo suplementado con FS disminuyó la demora en el escape, aumentó la enzima superóxido dismutasa y el radical OH⁻, y disminuyó la acetilcolinesterasa. Además, se administraron 2 dosis diferentes de FS (15 mg/kg y 30 mg/kg), donde se obtuvieron mejores resultados con la dosis superior (Zhang *et al.*, 2015). También se pudo observar la mejora de memoria en pacientes con EA leve al tener menores tiempos en la demora del recuerdo de palabras, tras 12 semanas de haber suplementado su dieta con un producto comercial en cuya composición contaba con 300mg EPA, 1200mg DHA, 106mg LP y 400mg/día entre otras vitaminas y minerales en menor proporción (Scheltens *et al.*, 2010). Por otro lado, son varios los estudios que sostienen una estrecha relación de la suplementación de AGPICL y el incremento de la concentración de LP del cerebro. Babenko *et al*, (2010) estudiaron el efecto de la suplementación de aceite de pescado y la suplementación con FS en ratas viejas, donde observaron que la administración de n-3 AGPICL y de FS provocaba un incremento de la FS endógena en el hipocampo, así como un incremento en EM y disminución de ceramidas (relacionadas con la pérdida neuronal), aunque no afectó a los niveles totales de los SL sintetizados *de novo*. En esta línea, McDaniel *et al.*, (2003), revisaron distintos ensayos de intervención de compuestos comercializados como potenciadores de la memoria, entre los que se encontraban FS y FC, por su posible acción frente al DCL asociado al envejecimiento. Los resultados

en animales indican que la FS atenúa muchas alteraciones neurológicas del envejecimiento y restaura la memoria normal para una elevada variedad de tareas. Sin embargo, en estudios realizados con humanos, FS y FC produjeron un modesto incremento en el recuerdo de listas de palabras en personas mayores con DCL, pero no en pacientes con enfermedad degenerativa grave. Jayaraman *et al.* (2008), corroboraron el efecto beneficioso de la FC, que ejercía como antioxidante sobre los AGPICL n-3 de las membranas celulares del cerebro en ratas a las que se le administró alcohol para provocar estrés oxidativo. En otro estudio llevado a cabo con 46 hombres adultos sanos se investigó si la ingesta diaria de un concentrado de LP afectaba positivamente la función cognitiva, el humor y la capacidad de manejar el estrés. Los voluntarios que consumieron 13,5 g/día del concentrado en LP de origen lácteo rico en FS y EM durante tres semanas, mostraron tiempos de reacción más cortos en las tareas de memoria en comparación con los individuos que tomaron placebo. Sin embargo, estos efectos sólo pudieron verse en aquellos individuos que sufrían situaciones de estrés agudo o crónico (Hellhammer *et al.*, 2010). Por otro lado, Wibrand *et al* (2013) concluyeron que la administración de 0.2g AK/día a ratas, derivaba en una mayor capacidad cognitiva y antidepresiva, mediante el estudio de su comportamiento en un Test basado en la desaparición de luz, así como una mayor expresión de los genes implicados en el crecimiento y diferenciación neuronal. Estos resultados también están de acuerdo con las conclusiones obtenidas por Lee *et al.* (2010), que observaron una mayor capacidad de aprendizaje y memoria en ratas viejas cuando se les administraba oralmente 20-50mg/kg AK. Además, esta suplementación aminoró la disminución de las enzimas acetilcolinesterasa y acetiltransferasa de colina del hipocampo, región del cerebro particularmente vulnerable en el envejecimiento cerebral. Sin embargo, otros estudios no han podido relacionar la suplementación de EPA y/o DHA con una mejora del estado cognitivo. Así, Stough *et al* (2012), administraron aceite de atún (0.25g DHA+0.06g de EPA/ día), a adultos de 45-77 años en los que no se obtuvieron efectos en atención, memoria secundaria, velocidad de atención ni velocidad de memoria.

2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

CAPÍTULO II. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

2.1. Objetivos

El trabajo realizado en la presente Tesis, ha sido desarrollado dentro del marco de un Proyecto del Programa Estatal de I+D+i referencia: AGL2014-56464, que lleva por título “Diseño y evaluación de un complemento nutricional enriquecido en fosfolípidos bioactivos para la prevención del deterioro cognitivo leve asociado al envejecimiento”

En base a los antecedentes descritos en la introducción, el **objetivo general** de la presente Tesis Doctoral fue:

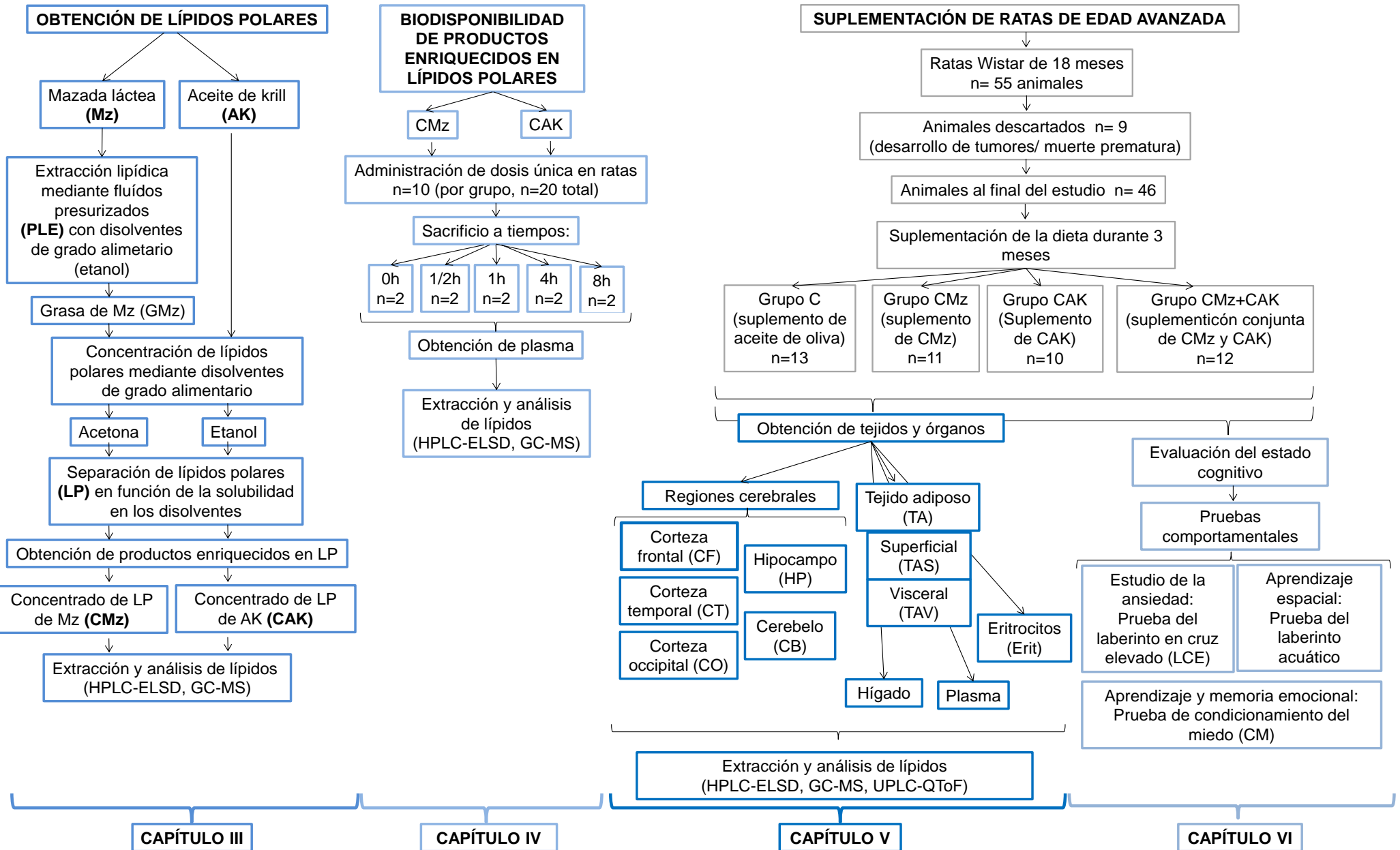
- La evaluación del efecto de la suplementación de lípidos polares de origen lácteo y marino en la prevención del deterioro cognitivo leve asociado al envejecimiento, mediante un estudio preclínico en ratas de edad avanzada.

Para la consecución de dicho objetivo general, se plantearon los siguientes **objetivos parciales**:

1. Obtención de complementos nutricionales ricos en lípidos polares a partir de concentrados de fosfolípidos obtenidos de mazada láctea y aceite de krill.
2. Determinación de la biodisponibilidad oral de los complementos enriquecidos en lípidos polares de mazada láctea y aceite de krill.
3. Estudio preclínico del efecto de la suplementación en la dieta del complemento nutricional enriquecido en lípidos polares de mazada láctea y/o aceite de krill en distintos tejidos y regiones cerebrales de ratas de edad avanzada
4. Evolución del perfil conductual y de la capacidad cognitiva de ratas de edad avanzada tras el consumo del complemento nutricional enriquecido en lípidos polares de mazada láctea y/o aceite de krill.

2.2. Plan de trabajo

Los objetivos anteriormente descritos, se desarrollan a lo largo de la presente Tesis Doctoral mediante el plan de trabajo que se muestra en el esquema descrito en la siguiente página, donde se estructuran en los diferentes capítulos que se mencionan y serán descritos en detalle en esta memoria:



**3. OBTENCIÓN DE PRODUCTOS ENRIQUECIDOS EN
LÍPIDOS POLARES DE MAZADA Y KRILL**

CAPÍTULO III: OPTIMIZACIÓN DE LOS PROCESOS DE OBTENCIÓN DE CONCENTRADOS RICOS EN LÍPIDOS POLARES DE MAZADA Y KRILL

1. INTRODUCCIÓN

Como ya se ha descrito en el Capítulo I, actualmente existe gran interés en el enriquecimiento en LP y AG n-3 en el campo de la alimentación funcional. Es aquí donde se plantea la búsqueda de fuentes ricas en estos compuestos potencialmente funcionales, lo que hace interesante el desarrollo de técnicas de aislamiento de LP y concentración de AG n-3 para el aprovechamiento óptimo de alimentos como el AK o de subproductos de la industria como la Mz. En este sentido, el krill, con una cantidad de aceite que oscila entre el 12-50% y cuya característica principal es su composición lipídica, es una importante fuente de AGPCL, principalmente EPA y DHA. Estos AG son susceptibles a la oxidación debido al elevado número de insaturaciones que presentan, no obstante, el AK contiene astaxantina como un potente antioxidante en su composición (Iwamoto *et al.*, 2010., Berge *et al.*, 2014). Estos AG se localizan mayoritariamente esterificados en los LP y en los DG, los hace característicos respecto a los aceites de pescado, donde se encuentran fundamentalmente en forma de TG (Winter *et al.*, 2010). Debido a estas propiedades, varios estudios han focalizado su investigación en AK con especial atención a la fracción de LP con el objetivo de su empleo como ingrediente potencialmente funcional (Castro-Gómez *et al.*, 2015; Ulven *et al.*, 2011). Se han desarrollado diferentes tecnologías para llevar a cabo la separación de los TG de los LP, como el empleo de acetona, la extracción de LP por extracción en fase sólida (SPE) *in situ* con etanol en yema de huevo (Nielsen *et al.*, 2007) o lecitina de soja (Wang 2004), así como la aplicación de temperaturas bajas de cristalización (winterización) (Vázquez y Akoh, 2011), el empleo de técnicas de extracción por fluidos supercríticos (SFE) (Henry *et al.*, 2008), o aislamiento de LP entre otras (Costa *et al.*, 2010; Spence *et al.*, 2009; Catchpole *et al.*, 2009; Subra-Paternault *et al.*, 2015). Estas técnicas, en general, permiten obtener extractos mediante el uso de disolventes *generalmente reconocidos como seguros* (GRAS), pero que sin embargo, necesitan largos procesos para llevar a cabo la separación o bien, el empleo de equipos de alto coste. Por otro lado, Aro *et al.*, (2009), mediante la

combinación de etanol y temperatura, reportaron un método sencillo de separación en un sólo paso, de los lípidos neutros de los LP de yema de huevo en polvo. Este proceso permite obtener una fracción compuesta principalmente por LP y otra rica en TG. En la misma línea, la Mz en polvo, como subproducto obtenido en el proceso de elaboración de mantequilla, cuenta con una composición aproximada de un 50% en lactosa, 35% en proteínas, 8% en grasa y 7.5% en cenizas. Del total de grasa, aproximadamente un 10-30% son LP (Sodini *et al.*, 2006). A pesar de la importancia en cuanto a la amplia distribución en LP que posee, su contenido total en grasa es escaso respecto a otras fuentes de LP ampliamente usadas como la lecitina de huevo, con un 60% de lípidos en peso seco (El Bagir, *et al.*, 2006, Morin *et al.*, 2007). Por esta razón, se plantea interesante el hecho de poder separar la fracción lipídica del producto para conseguir una mayor concentración de LP. Una técnica habitual de extracción de lípidos totales, es el método desarrollado ya en el 1957 por Folch (Folch *et al.*, 1957), sin embargo, es laborioso y contaminante por el uso de disolventes orgánicos como el cloroformo. En este sentido, los métodos basados en la extracción lipídica bajo condiciones de presión, permiten la utilización de disolventes GRAS como el etanol. Un ejemplo de ello es la extracción con líquidos presurizados (PLE), técnica que permite la obtención de extractos de elevada pureza y alto rendimiento, bajo condiciones de presión y temperatura a escala piloto. Carabias-Martínez *et al.* (2005) revisa el empleo de la técnica PLE, donde confirma la capacidad de extraer materia grasa de diversas matrices alimentarias y biológicas, sin el uso de pretratamientos agresivos, con la obtención de rendimientos de extracción similares respecto a métodos tradicionales. Del mismo modo, Castro-Gómez *et al.*, (2014a), compararon el rendimiento de extracción y el perfil lipídico de grasa de la leche en polvo obtenida por procesos de atomización y liofilización con el método oficial de referencia (ISO, 2001), Folch y las condiciones optimizadas para PLE, obteniendo mejores resultados y tiempos considerablemente menores con el empleo de PLE, en lugar del uso de técnicas tradicionales de extracción de lípidos.

El uso de diferentes disolventes de grado alimentario, como etanol o acetona, ha sido ampliamente investigado para el proceso de aislamiento de la fracción rica en LP en aceites, para la industria de alimentos ricos en LP (Guiotto *et al.*, 2013, Cabezas *et al.*, 2009, Wang *et al.*, 2004). En este sentido, el empleo de etanol o acetona de grado alimentario podría ser un método sencillo en el aislamiento de fracciones ricas en LP como ingrediente funcional.

2. OBJETIVOS

El objetivo del presente estudio ha sido desarrollar un procedimiento sencillo, escalable y económico que permita el aislamiento de la fracción de LP de fuentes alimentarias ricas en estos compuestos, como Mz y AK, mediante el empleo de disolventes GRAS para la obtención de un potencial ingrediente funcional.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Muestras

➤ Mazada láctea

La Mz en polvo fue donada por Reny Picot (Asturias, España) y su composición se muestra en la ficha técnica del producto en la Tabla 3.1. La muestra se mantuvo a -35°C hasta su análisis.

Tabla 3.1. Ficha técnica de la composición físico-química de la mazada en materia seca.

	g/ 100g producto
Grasa	6,3
Proteína	31,9
Humedad	2,8
Acidez	1,3
Cenizas	7,3

➤ Aceite de krill

El (AK) antártico de *Euphausia superba* fue donado por AKO3™ (Aker Biomarine Antarctic AS, Oslo, Noruega) y su composición se muestra en la ficha técnica del producto en Tabla 3.2. El AK se recibió y mantuvo en botella de acero inoxidable de 250 mL a 4°C hasta su análisis.

Tabla 3.2. Información recogida de la ficha técnica de la composición físico-química del aceite de krill (AKO3™).

	g/ 100g producto
Fosfatidilcolina	36,0
C20:5 n3 (EPA)	13,5
C22:6 n3 (DHA)	7,3
AG n-3	24,8
AG n-6	1,7

3.2. Reactivos y disolventes

Todos los disolventes utilizados fueron de grado HPLC. Cloroformo, hexano, metanol, trimetil pentano, 2-propanol, hidróxido de amonio y ácido sulfúrico (95%) fueron suministrados por LABSCAN (Dublín, Irlanda). El etanol (96%) fue adquirido de PANREAC (Barcelona, España). Ácido fórmico (98%), trietilamina (99.5%), metóxido de sodio, tritridecanoína (C39:0), tridecanoato (C13:0), ácido mirístico (C14:0), ácido palmítico (C16:0), ácido esteárico (C18:0), AA (20:4), EPA (20:5) y DHA (22:6), monoestearina, dioleína, FE, FI, FS, FC, EM y la mezcla de ácidos grasos metil-éster (EMAG) de referencia Supelco 37 FAME mix fueron suministrados por Sigma (St. Louis, MO, EEUU).

3.3. Extracción de grasa de mazada

La extracción de la grasa de la Mz (GMz) se llevó a cabo por PLE. Se utilizó un equipo de extracción sólida acelerada ASE-200 (Dionex Corp Sunnyvale, CA, EEUU) con el empleo de 15 g de Mz en polvo mezclado con arena de mar en relación 1:1 en celdas de extracción de acero inoxidable con una capacidad de 33 mL. Con el fin de obtener el máximo rendimiento en grasa, la temperatura de la extracción se fijó en 60°C, en base a los resultados previos de nuestro Grupo detallados en Castro-Gómez *et al.*, (2014a), con una presión fijada a 10.3 MPa. Se compararon diferente número de ciclos y tiempos de extracción (Tabla 3.3.). Los disolventes de los extractos obtenidos fueron evaporados en un evaporador rotatorio a vacío (modelo Strike 202, Steroglass, S.r.l. Perugia, Italia). Los extractos lipídicos finales se pesaron y almacenaron a -35°C en viales ambar con N₂ hasta su análisis.

3.4. Concentración de lípidos polares

3.4.1. Fraccionamiento de grasa de mazada

La GMz obtenida previamente por PLE con etanol, se disolvió con acetona en una relación 1:5 (p/v). La mezcla se mantuvo en un agitador orbital durante 10 min y posteriormente se centrifugó a 1500g, 5 min a 20°C. La fase superior se descartó y el precipitado se sometió al mismo proceso incorporando más acetona en una relación 1:2 (p/v). El precipitado obtenido se evaporó y fue almacenado a -35°C con N₂ hasta su análisis (Figura 3.1.). Los ensayos se llevaron a cabo por triplicado.

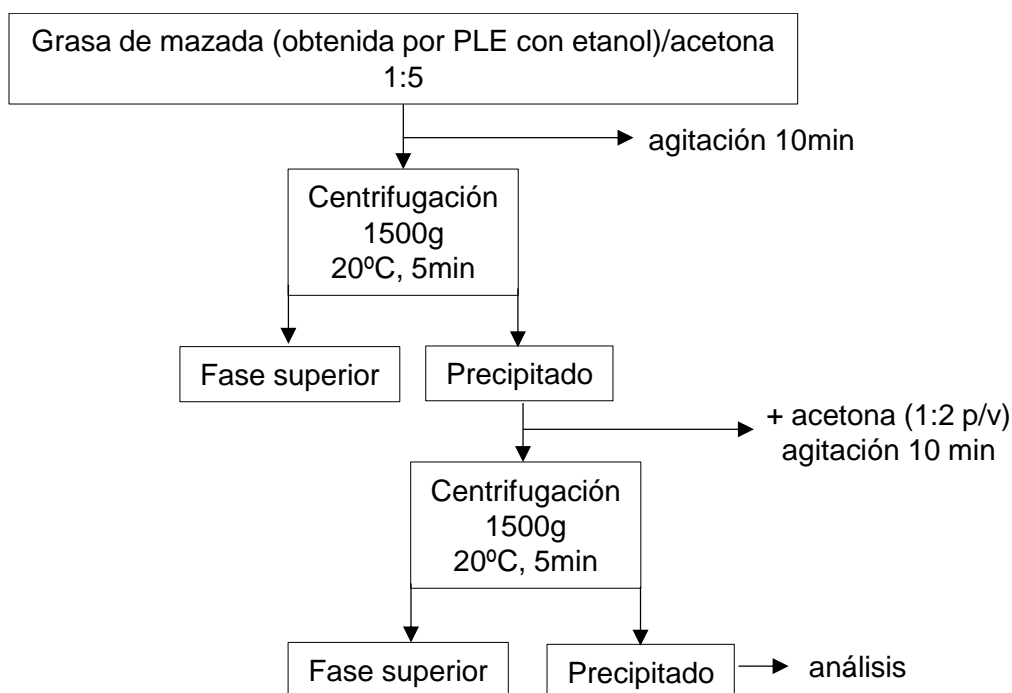


Figura 3.1. Esquema del fraccionamiento de grasa de mazada

3.4.2. Fraccionamiento de aceite de krill

El AK fue disuelto en etanol 96% (v/v) en una proporción 1:8 (p/v) en viales de 4 mL y se mantuvieron 24h a diferentes temperaturas (20°C, 4°C, -20°C y -35°C). Posteriormente, la fase superior polar obtenida (FSP) fue recuperada en un segundo vial y evaporada bajo corriente de N₂. En el segundo vial, en una de las réplicas de cada temperatura a las 24h, el extracto fue evaporado y pesado. Posteriormente, se sometió a las mismas condiciones descritas anteriormente durante otras 24h. Ambas fases superiores (a 24h y a 48h), se evaporaron y se analizó su perfil lipídico (esquema en Figura 3.2.). Los ensayos se llevaron a cabo por triplicado.

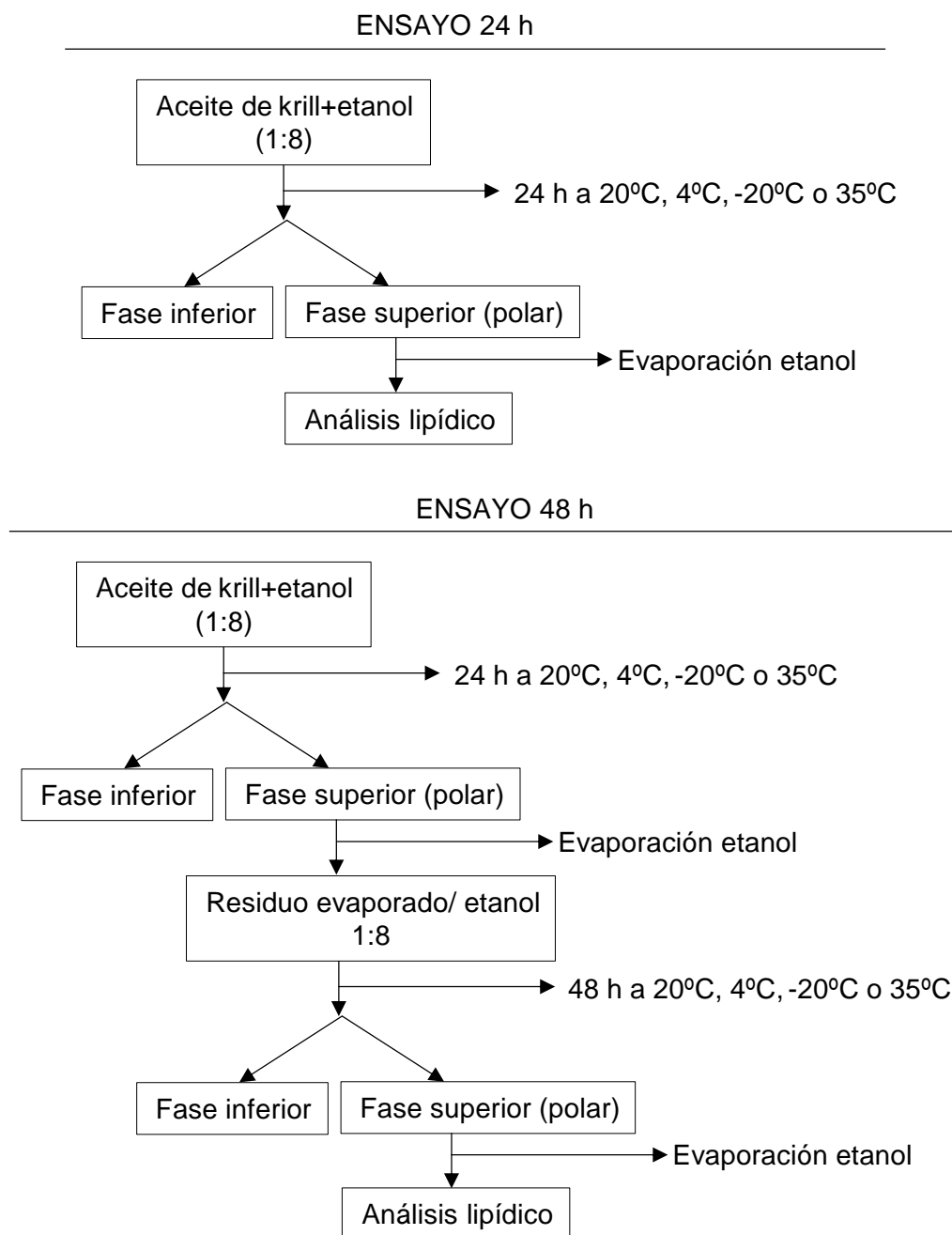


Figura 3.2. Esquema del fraccionamiento de aceite de krill. Ensayos de 24h y de 48h.

3.5. Análisis de las clases lipídicas por HPLC-ELSD

Las clases lipídicas de la GMz, el AK, así como los productos obtenidos en los fraccionamientos descritos en los apartados anteriores, fueron analizadas por HPLC Agilent Technologies, modelo 1200 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EEUU), acoplado a un detector evaporativo de dispersión de luz (ELSD) (SEDERE. SEDEX 85 model, Alfortville Cedex, Francia), con el empleo de aire comprimido prefiltrado como

nebulizador del gas a una presión de 350 KPa, temperatura de 60°C y ganancia 3. Para la separación cromatográfica se acoplaron dos columnas en serie Zorvax Rx-SI (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) de 250 mm × 4.5 mm, 5 µm de tamaño de partícula con una precolumna con mismo relleno, equilibradas a una temperatura de 40°C. El volumen de inyección fue de 50 µL a una concentración de 5 mg/mL en diclorometano. Las fases móviles y el gradiente de disolventes se realizaron como se detalla en Castro-Gómez *et al.* (2014b). Se emplearon patrones para la identificación de las clases lipídicas de las muestras. Los análisis se llevaron a cabo por triplicado.

3.6 Análisis de ésteres metílicos de ácidos grasos

La GMz, AK, y los productos obtenidos en sus fraccionamientos, fueron derivatizados siguiendo el método de metilación ácido-base reportado por Castro-Gómez *et al.* (2015). Los EMAG fueron separados en una columna capilar de sílice CP-Sil 88 (100m x 25 mm x 0.2 µm Chrompack, Middelburg, Países Bajos) en un cromatógrafo de gases Agilent Technologies (modelo 6890N, Palo Alto, CA, EEUU) acoplado a un detector MS (Agilent Technologies 5973N) que opera en modo escáner con rangos entre 50 a 550 Da. Las condiciones cromatográficas empleadas fueron previamente descritas por Rodríguez-Alcalá y Fontecha (2007). Brevemente, la columna se mantuvo a 70°C durante 1 min tras la inyección, el programa de temperaturas fue de una primera rampa de 7°C/min hasta 170°C donde se mantuvo 55 min. Posteriormente pasó a 230°C a un incremento de 10°C/min durante 33 min. La temperatura del inyector fue de 250°C. El gas portador empleado fue helio, con una presión de entrada a columna de 30 psi. Las condiciones del detector MS fueron de 250°C en la línea de transferencia, 230°C en la fuente y 150°C en el cuadrupolo, con un voltaje de 70eV en la ionización por impacto electrónico. Para la identificación de los picos se empleó su espectro de masas en la librería del Instituto Nacional de Patrones y Tecnología (NIST) (Gaithersburg, MD, 193 EEUU). El volumen de inyección fue de 1 µL a una concentración de 5mg/mL en modo split 1:25. Para el análisis cualitativo y cuantitativo se emplearon factores de respuesta de una mantequilla anhidra de composición conocida (MGLA) y una mezcla Supelco FAME mix. Como patrón interno se utilizó tritridecanoato (TG-C13) (100µL a 1.28mg/mL). Los análisis se llevaron a cabo por triplicado.

3.7. Análisis estadístico

Todos los resultados fueron analizados por triplicado y expresados como media y desviación estándar ($n=3$ en cada muestra). Se realizó un análisis exploratorio de los datos para comprobar una distribución normal y homogeneidad de la varianza y detección de posibles diferencias significativas en clases lipídicas y composición de EMAG entre GMz y su concentrado (CGMz), así como de AK y las FSP con pruebas no paramétricas con el empleo de Bonferroni como estudio post-hoc. El programa utilizado para ello fue el paquete SPSS (SPSS 22.0 for Windows, SPSS inc. IBM, Armark, Nueva York, EEUU). El nivel de significancia se fijó en 95%.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Enriquecimiento en lípidos polares de mazada

4.1.1. Extracción de grasa de mazada por el método PLE

En la Tabla 3.3. se muestran los diferentes métodos de extracción ensayados mediante PLE. La temperatura seleccionada para todos los experimentos fue de 60°C para evitar la degradación de los compuestos lipídicos observado anteriormente en el estudio realizado por Castro-Gómez *et al.*, (2014a), que compararon la extracción de grasa de leche de vaca, cabra y oveja por 3 métodos de extracción: método oficial de extracción de grasa (ISO, 2001), método Folch y método PLE. En la extracción llevada a cabo en el equipo de PLE, utilizaron temperaturas de 60°C, 80°C y 100°C, así como diferente número de ciclos en la extracción de grasa de las muestras de leche liofilizadas con diclorometano/metanol (2:1). Los resultados que obtuvieron mostraron la extracción total de grasa a las temperaturas evaluadas, sin embargo, a temperaturas superiores de 60°C, se generaba la aparición de ácido fosfatídico por la degradación de LP de la muestra (Changi *et al.*, 2012).

Todos los experimentos del presente estudio se realizaron con etanol. En base a la ficha técnica de composición de la Mz facilitada por Reny Picot (Tabla 3.1., 6.25% grasa), se puede observar un rendimiento graso ligeramente superior en todos los tiempos de extracción (de 6.8% a 7.5%). Con la aplicación de un ciclo de 8 min, fue el ensayo que menos rendimiento en grasa obtuvo con un 6.8%. Con los resultados obtenidos tras los tres ensayos, se seleccionaron como condiciones óptimas el empleo 2 ciclos de 5 min. Flores Pérez *et al.*, (2006) compararon las técnicas Soxhlet, extracción asistida por ultrasonidos y PLE en terpenos, AG y vitamina E de *Piper*

guadichaudianum Kunth y mostraron que los rendimientos más altos fueron en la extracción por PLE llevada a cabo con etanol en lugar de éter de petróleo.

Tabla 3.3. Experimentos de la extracción de GMz mediante PLE a 60°C con etanol.

Experimento	Ciclos (nº)	Tiempo (min)	g grasa/ 100 g mazada		Rendimiento grasa % (respecto a Ficha del producto)
			Media	DE	
1	2	5	7,48 ± 0,45	a	119,68
2	3	5	7,34 ± 0,80	a	117,44
3	1	8	6,84 ± 0,46	b	109,44

Las letras diferentes a la derecha muestran diferencias significativas ($p < 0.05$).

4.1.2. Concentración en lípidos polares

El proceso de enriquecimiento en LP de la GMz se basó en la diferente solubilidad de las diferentes clases lipídicas en el disolvente empleado en función de su polaridad. En general, el empleo de etanol es ampliamente utilizado para la obtención de extractos ricos en LP en combinación con acetona. En este estudio, se realizó un ensayo previo donde se comparó la solubilidad de GMz en acetona a distintas relaciones, 1:3 y 1:5 (p/v). Como se observa en la Figura 3.3, se obtuvo un mayor rendimiento de LP en el ensayo cuando la relación inicial era de 1:5 con un 56% respecto al 42% de LP con una relación 1:3 (p/v). En un segundo fraccionamiento con una relación 1:2 en cada uno de los ensayos anteriores, se consiguió aumentar el rendimiento en LP del precipitado obtenido en ambos casos, con un 59% y 64% de LP respectivamente (Figura 3.3.).

Guiotto *et al.* (2013) estudiaron el proceso de fraccionamiento de lecitina de girasol con el uso de diferentes relaciones etanol/agua, con la consecuente obtención de dos fracciones, una rica en FC, con un incremento de hasta un 15.6% y otra fracción rica en FI con un valor de 52%. Wang *et al.*, (2004), observaron cómo la recuperación de LP aumentó levemente con un segundo fraccionamiento, pero disminuyó de manera significativa con una tercera separación. En esta línea, tras los experimentos previos llevados a cabo en el presente estudio, se escaló la cantidad de GMz/acetona, manteniendo la relación de 1:5 para un primer fraccionamiento y 1:2 para el segundo, donde se consiguió hasta un 85% de LP en la fracción insoluble en acetona (Figura 3.3.).

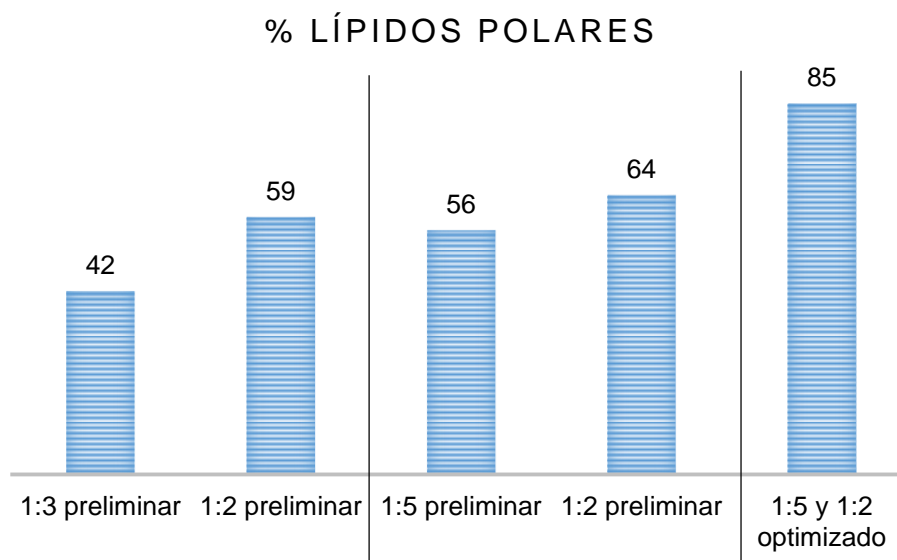


Figura 3.3. Porcentaje de lípidos polares de las fracciones (g lípidos polares/100 g producto Mz en polvo) en ensayos previos y ensayo optimizado de concentración de lípidos polares.

4.1.3. Análisis de las clases lipídicas mediante HPLC-ELSD

La distribución en clases lipídicas de GMz y concentrado en GMz rica en LP (CGMz) después del proceso empleado, se detalla en la Tabla 3.5. La GMz muestra un contenido aproximado de un 13% en LP, con una distribución de 13% FE, 1.5% FI, 14.2% FS, 48% en FC y 24% en EM. Estos resultados están de acuerdo con los reportados por Castro Gómez *et al.*, (2016), que obtuvieron un 14% de LP en Mz en polvo extraída con etanol por PLE. En este contexto, Rodríguez-Alcalá y Fontecha (2010) determinaron un rango de LP en GMz entre 10-30%. Por otra parte, como se puede observar en la Tabla 3.5., las clases lipídicas mayoritariamente neutras (TG, DG, AGL+Col y MG) fueron desplazadas parcial o totalmente y no se encuentran en el CGMz debido a su escasa solubilidad en acetona, por lo que el precipitado se compuso principalmente de LP en un 86% (Figura 3.4.).

Además, la distribución en LP entre la GMz y el CGMz fue la misma para todos los LP ($p < 0.05$). Gladkowski *et al* (2012), ensayaron dos métodos basados en el empleo de acetona y/o etanol para la obtención de una fracción rica en LP de yema de huevo. Se comparó el rendimiento y composición de, por un lado, lo que describieron como “método 1” un extracto de yema de huevo en el que previamente se eliminó la grasa con acetona a una temperatura de 4°C y un extracto de yema de huevo obtenido por el “método 2”, que se llevó a cabo con etanol como disolvente de extracción y acetona a -20°C, para la precipitación posterior de la fracción polar. Ambos métodos obtuvieron

rendimientos de aproximadamente el 10% en LP (g LP/100 g yema de huevo), con una pureza del 86% y del 100% en LP para los métodos 1 y 2, respectivamente. Cabe destacar el empleo de hexano en el paso previo a la concentración de LP con acetona en ambos métodos. En esta línea, Jangle *et al* (2013) emplearon diferentes relaciones de acetonitrilo/hexano para la concentración de LP de aceite soja. El valor más alto obtenido, tanto en rendimiento como en pureza, fue de aproximadamente un 80% de FC al emplear la proporción 20:1 de acetonitrilo/hexano.

Tabla 3.5. Distribución de clases lipídicas de grasa de mazada (GMz) y concentrado de grasa de mazada (CGMz) rico en LP en g/ 100g producto.

Clases lipídicas (% en	GMz		CGMz	
	Media	DE	Media	DE
TG	72,87 ±	2,30 a	8,61 ±	3,05 b
DG	12,52 ±	0,94 a	0,59 ±	0,14 b
AGL+Col	1,87 ±	0,15 a	0,21 ±	0,02 b
MG	0,07 ±	0,01 a	0,02 ±	0,00 b
Glucer	0,21 ±	0,01 a	1,01 ±	0,10 b
LacCer	0,20 ±	0,01 a	2,76 ±	0,10 b
FE	1,55 ±	0,26 a	14,15 ±	1,02 b
FI	0,18 ±	0,02 a	1,21 ±	0,05 b
FS	1,75 ±	0,16 a	12,39 ±	0,52 b
FC	5,87 ±	1,41 a	35,73 ±	1,57 b
EM	2,92 ±	0,74 a	23,32 ±	0,43 b
ΣLP	12,27 ±	1,21 a	86,83 ±	3,27 b
% de LP				
FE	12,60 ±	0,41	16,29 ±	0,58
FI	1,46 ±	0,06	1,40 ±	0,04
FS	14,25 ±	0,29	14,27 ±	0,12
FC	47,84 ±	1,59	41,16 ±	0,56
EM	23,84 ±	5,17	26,88 ±	0,86

EC: éster de colesterol, T-D-MG: tri-di-monoglicéridos, AGL: ácidos grasos libres, Col: colesterol, Glucer: glucosilceramida, LacCer: lactosilceramida, FE-I-S-C: fosfatidiletanolamina-inositol-serina-colina, EM: esfingomielina, LP: lípidos polares. Letras diferentes a la derecha en la misma línea muestran diferencias significativas con intervalo de 95% de confianza.

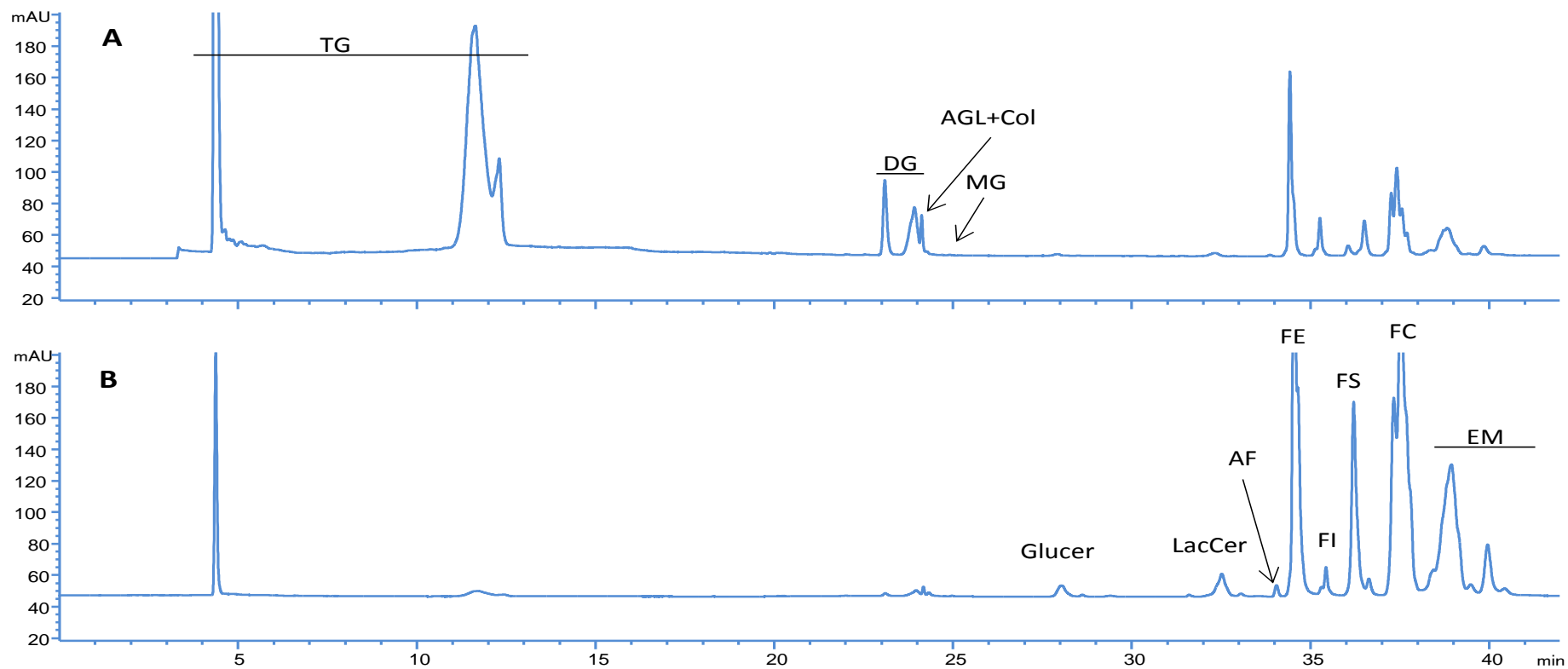


Figura 3.4. Cromatogramas de grasa de mazada (A) y grasa de mazada concentrada en lípidos polares (B) a 5mg/mL. TG: triglicéridos, DG: diglicéridos, AGL+Col: ácidos grasos libres y colesterol, MG: monoglicéridos, Glucer: glucosilceramidas, LacCer: lactosilceramidas, FE: fosfatidiletanolamina, FI: fosfatidilinositol, FS: fosfatidilserina, FC: fosfatidilcolina, EM: esfingomielina.

4.1.4 Análisis de los ácidos grasos metil ésteres mediante análisis de GC-MS

La distribución de los EMAG obtenidos en GMz y CGMz se detalla en la Tabla 3.7. El análisis del perfil en AG de Mz en el presente estudio, mostró como AG mayoritarios, el C14:0, C16:0, C18:0 y 18:1 n-9. Kristensen *et al.* (2004) reportaron resultados similares en un estudio en el que compararon el perfil de AG de 2 tipos de Mz (procedentes del empleo de diferente alimentación al rumiante), donde reportaron un contenido en C14:0 entre 15-10%, C16:0 entre 36-25%, C18:0 6-11% y 18:1 n-9 entre 18-31%, como los principales AG, no obstante, con diferente distribución en función del tipo de Mz.

Tabla 3.7. Porcentaje de EMAG de grasa de mazada y concentrado rico en LP de grasa de mazada en g EMAG/ 100 g producto.

g EMAG /100g producto	GMz		CGMz	
	Media	DE	Media	DE
C4	5,56 ±	1,24 a	-	b
C6	3,19 ±	0,19 a	0,67 ±	0,10 b
C8	1,41 ±	0,17 a	0,31 ±	0,06 b
C10	2,61 ±	0,37 a	0,60 ±	0,14 b
C12	3,31 ±	0,26 a	0,94 ±	0,12 b
C14	11,45 ±	0,60 a	6,23 ±	0,29 b
C15i	0,84 ±	0,04 a	0,17 ±	0,02 b
C14:1	1,23 ±	0,02 a	0,89 ±	0,03 b
C16	32,92 ±	0,42 a	26,70 ±	0,53 b
C16:1 c9	1,96 ±	0,02 a	1,62 ±	0,03 b
C18	11,25 ±	0,50	11,63 ±	0,03
C18:1 11t	1,27 ±	0,10 a	0,92 ±	0,02 b
C18:1 9c	25,13 ±	0,24 a	34,16 ±	0,59 b
C18:1 11c	0,75 ±	0,06 a	0,87 ±	0,03 b
C18:2 n6	3,60 ±	0,08 a	8,67 ±	0,38 b
C18:2 c9,t11	0,47 ±	0,05 a	0,65 ±	0,04 b
C20:3 n6	0,16 ±	0,03 a	0,58 ±	0,03 b
C20:4 n6	0,26 ±	0,00 a	0,89 ±	0,06 b
Σ<0,5	4,70 ±	0,32	4,56 ±	0,19
ΣAGS	72,54 ±	0,42 a	47,25 ±	0,45 b
ΣAGMI	30,34 ±	0,13 a	38,46 ±	0,64 b
ΣAGPI	4,49 ±	0,12 a	10,79 ±	0,32 b
Σn-6	4,02 ±	0,08 a	10,14 ±	0,40 b
Σn-3	0,16 ±	0,03 a	0,58 ±	0,03 b
Σn.i.	0,64 ±	0,03 a	0,47 ±	0,01 b

AGS: ácidos grasos saturados, AGMI: ácidos grasos monoinsaturados, AGPI: ácidos grasos poliinsaturados, n.i.: no identificados. Letras diferentes a la derecha en la misma línea muestran diferencias significativas en un intervalo de confianza del 95%.

Ménard *et al.*, (2010) presentaron una distribución similar para la fracción lipídica de leches de vaca y búfalo. Zhu *et al* (2013) consiguieron obtener lecitina de suero de quesería mediante una extracción basada en el empleo de etanol a pH 4.5 y 6.5 consecutivamente, cuya distribución presentó un 31% de LP, similar a la composición lipídica de Mz. Los EMAG del extracto mostraron valores en concordancia con los del presente estudio en GMz (8.3% C14:0, 13% C18:0, 25% OA). Del mismo modo, López *et al.* (2008) reportaron valores similares en nata de leche. Los AG del CGMz mostraron una distribución del perfil lipídico distinta respecto a la GMz con una disminución en los AGS: C14:0 (de 11% a 6%) y C16:0 (de 33% a 27%), así como en AGCC: de 10% a 1% C4:0 y C8:0 en CGMz, así como un incremento significativo de los AG insaturados de larga cadena ($p<0.05$): 25% a 34% de OA; 3.6% a 8.6% AAL, de GMz a CGMz respectivamente (Figura 3.7.).

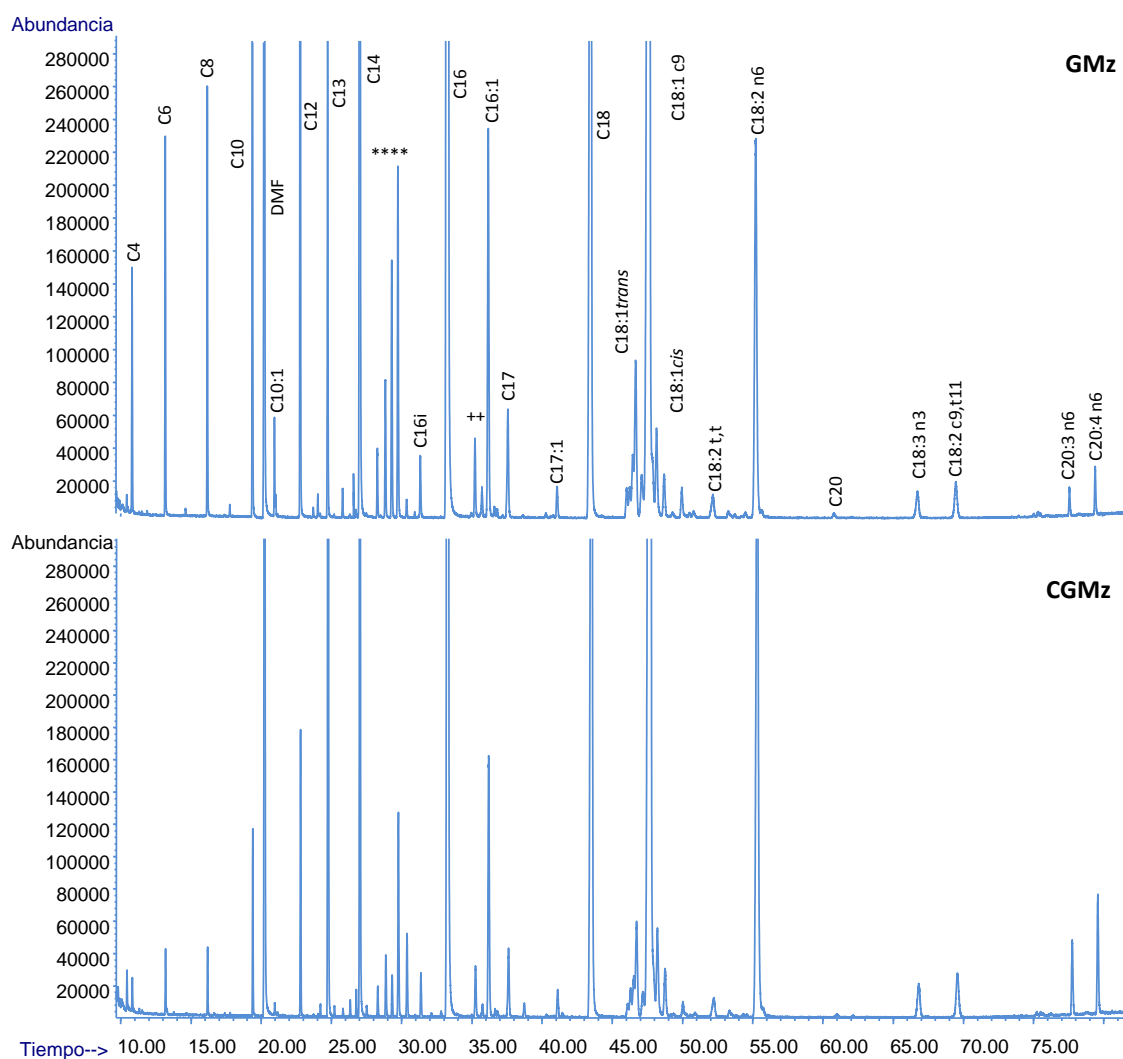


Figura 3.7. Cromatogramas (GC-MS) de grasa de mazada (GMz) y grasa de mazada concentrada en lípidos polares (CGMz) a 5mg/mL. De izquierda a derecha: *C15ai, *C15i, *C14:1 y *C15, +C16:1t, +C17ai.

Estos resultados están de acuerdo con los reportados por Jensen y Nielsen (1996), y López *et al.*, (2008), con un menor contenido en AGCC y AGS como C14:0 y C16:0 en la fracción lipídica polar de la nata.

4.2. ENRIQUECIMIENTO EN LÍPIDOS POLARES DE ACEITE DE KRILL

4.2.1. Concentración en lípidos polares

En la Tabla 3.4. se muestran los datos del rendimiento obtenido en las FSP respecto al AK total. Se encontraron diferencias significativas en el rendimiento de las FSP tras 24h a las temperaturas empleadas. La separación realizada a 20°C obtuvo el mayor rendimiento con un valor >70% p/p del total del AK inicial respecto al 49-58% en el resto de ensayos a diferentes temperaturas. En cuanto al experimento realizado durante 48h a 20°C no se logró obtener una segunda FSP debido a la ausencia de fases. No se obtuvieron diferencias significativas en este tiempo en los rendimientos grasos obtenidos en las FSP a 4°C, -20°C y -35°C ($p < 0.05$) (Tabla 3.4.).

Tabla 3.4. Rendimientos grasos de la fase superior polar (FSP) del fraccionamiento del aceite de krill (AK) total (%p/p) a 20°C, 4°C, -20°C y -35°C tras 24 y 48h.

T ^a	24 h		48 h	
	Media ±	DE	Media ±	DE
20°C	72,04 ±	4,38 a,b	-	-
4°C	57,67 ±	5,20 a,b	48,42 ±	5,14 b
- 20°C	52,21 ±	6,15 b	55,01 ±	12,99 b
- 35°C	49,31 ±	5,85 b	42,05 ±	2,56 b

Las letras a la derecha marcan las diferencias significativas con un nivel de confianza del 95%.

4.2.2. Análisis de las clases lipídicas mediante HPLC-ELSD

La composición en clases lipídicas del AK y las FSP obtenidas tras 24h y 48h de conservación en etanol a las diferentes temperaturas y posteriormente analizadas por HPLC-ELSD se muestran en la tabla 3.6. El AK se compone principalmente de TG y FC a unas concentraciones de 55% y 37% respectivamente. Estos valores se corresponden con los reportados con anterioridad por Ju *et al.*, (2004), quienes observaron valores superiores del 45% de TG, así como Yoshitomi *et al.*, (2006), que reportan rangos de 79-65% y 19-33% para TG y FC respectivamente. En cuanto a las clases lipídicas minoritarias, DG, AGL+Col, MG y FE, se obtuvieron valores de acuerdo con los datos obtenidos por Castro-Gómez *et al.*, (2015). La distribución de clases lipídicas fue diferente significativamente en todas las fracciones de FSP respecto al AK (Figura 3.5.).

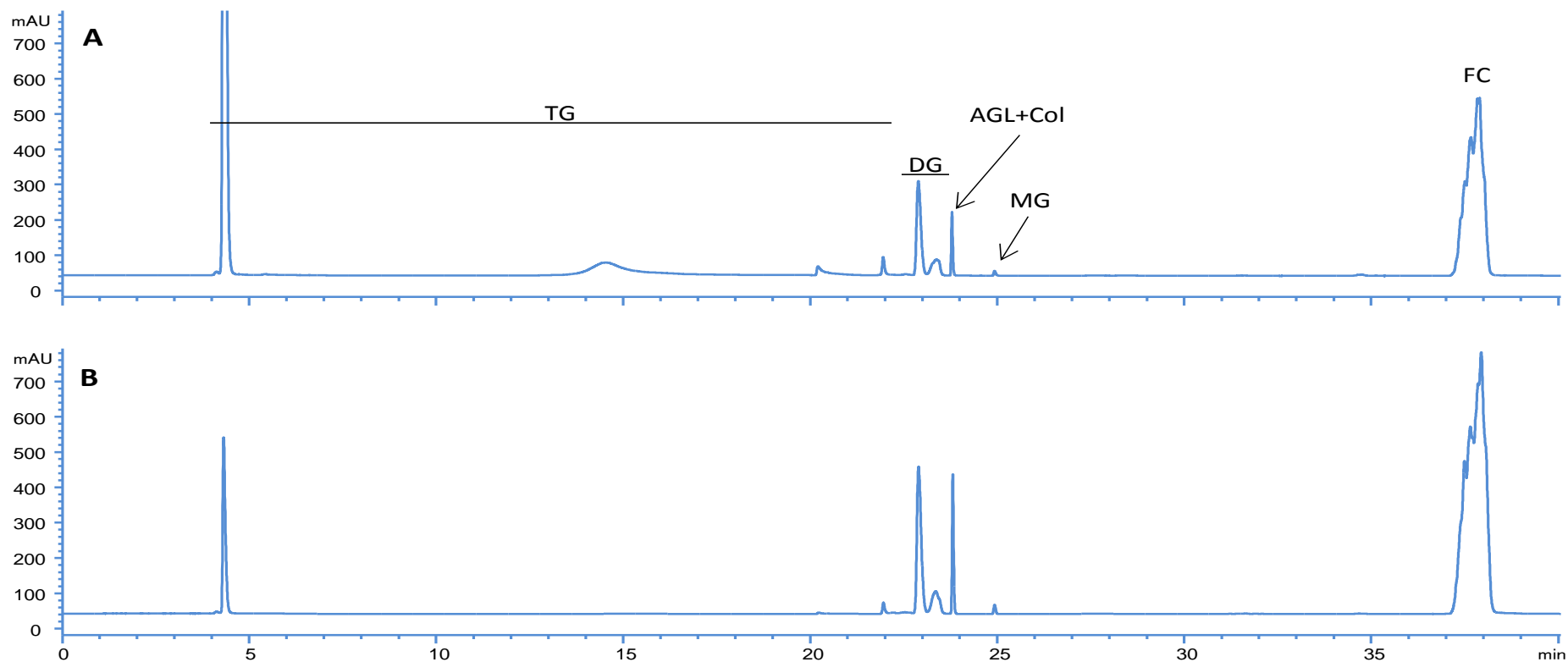


Figura 3.5. Cromatogramas de aceite de krill (A) y aceite de krill concentrado en lípidos polares (B) a 5mg/mL. TG: triglicéridos, DG: diglicéridos, AGL+Col: ácidos grasos libres y colesterol, MG: monoglicéridos, FC: fosfatidilcolina.

Como se puede observar en la Tabla 3.6., la menor temperatura empleada (-35°C) es claramente la que contiene lípidos con mayor polaridad, DG y LP en la FSP. El contenido en las clases lipídicas de mayor polaridad tuvo un incremento significativo en el experimento a 48h respecto al de 24h en la FSP obtenida a -20°C , sin embargo, a 4°C y -35°C , aunque sí se observó esta tendencia, no se establecieron diferencias significativas entre 24h y 48h ($p < 0.05$) (Tabla 3.6.). Esta tendencia también la observaron Wu y Wang (2004) en el fraccionamiento de FC y FI de lecitina de soja, donde reportaron un incremento no significativo en la recuperación de FC en un segundo fraccionamiento.

En cuanto a la recuperación de las diferentes clases lipídicas en las fases obtenidas, tanto DG y FC mostraron un 100% de recuperación respecto a la cantidad inicial en el AK, sin embargo, la recuperación de TG mostró su máximo valor a 20°C con, aproximadamente, un 40% (Figura 3.6.) ($p > 0.05$ entre cada temperatura y tiempo). Como se ha descrito anteriormente, el empleo de temperaturas bajas obtuvo valores menores del 30% hasta llegar a un 10% a -20°C y -35°C tras 48h como valor más bajo obtenido. La recuperación de FC obtenida en el presente estudio fue mayor que la reportada por Palacios y Wang (2005), que obtuvieron una recuperación del 60% de FC de yema de huevo mediante un fraccionamiento con el empleo de etanol.

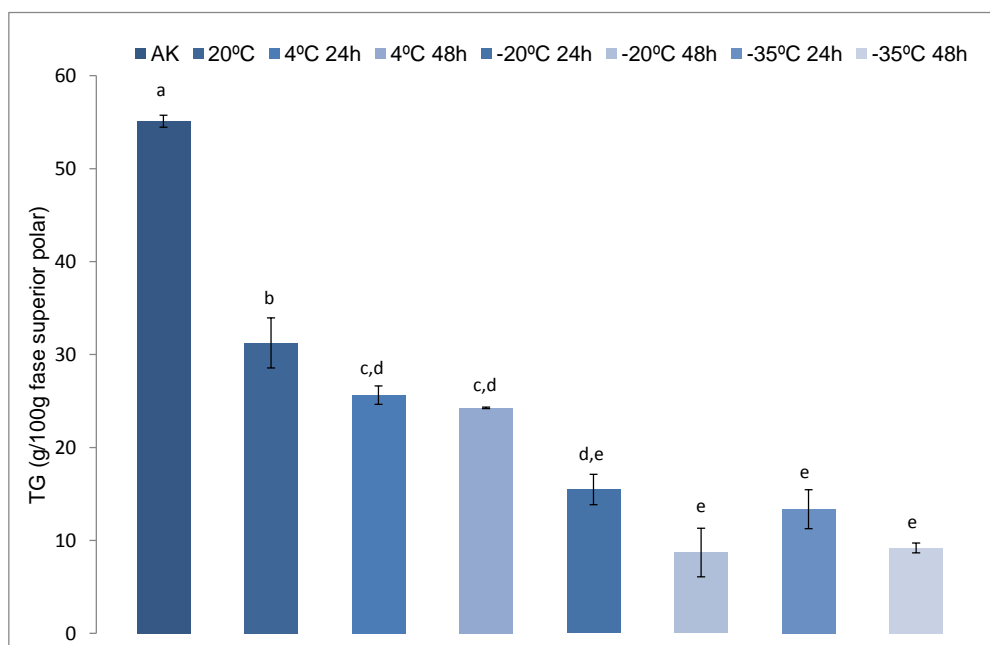


Figura 3.6. Recuperación de triglicéridos (TG) en la fase etanólica (FSP) a 20, 4, -20°C y -35°C a 24 y 48h. AK: aceite de krill. Letras diferentes muestran diferencias significativas con un intervalo de confianza de 95%.

CAPÍTULO III

Tabla 3.6. Clases lipídicas (% p/p) de aceite de krill (AK) y fases superiores polares (FSP) a 20°C, 4°C, -20°C y -35°C tras 24 y 48h por HPLC-ELSD.

Clase lipídica (%)	AK	20°C	4°C 24h	4°C 48h	-20°C 24h	-20°C 48h	-35°C 24h	-35°C 48h
	Media ± DE	Media ± DE	Media ± DE	Media ± DE	Media ± DE	Media ± DE	Media ± DE	Media ± DE
TG	55,11 ± 0,64 a	31,25 ± 2,69 b	25,63 ± 0,98 c	24,25 ± 0,08 c	15,48 ± 1,64 d	8,69 ± 2,62 e,f	13,36 ± 2,09 d,f	9,19 ± 0,53 f
DG	6,45 ± 0,37 a	10,59 ± 0,44 b	10,84 ± 0,07 b,c	10,73 ± 0,13 b,c	12,19 ± 0,76 c,d,e	13,50 ± 1,54 e	12,07 ± 0,29 b,c,e	12,66 ± 0,30 d,e
AGL+Col	1,04 ± 0,11 a	1,95 ± 0,15 b	2,23 ± 0,07 b	2,24 ± 0,02 b	2,66 ± 0,18 c	2,74 ± 0,16 c	2,65 ± 0,10 c	2,77 ± 0,07 c
MG	<0.2 -	<0.2 -	<0.2 -	<0.2 -	<0.2 -	<0.2 -	<0.2 -	<0.2 -
FE	<0.2 -	<0.2 -	<0.2 -	<0.2 -	<0.2 -	<0.2 -	<0.2 -	<0.2 -
FC	37,00 ± 0,67 a	55,90 ± 2,74 b	60,90 ± 1,08 c	62,33 ± 0,10 c	69,20 ± 0,78 d	74,83 ± 1,41 e	71,47 ± 1,86 d,e	74,93 ± 0,72 e

TG: triglicéridos, DG: diglicéridos, AGL+Col: ácidos grasos libres+ colesterol, MG: monoglicéridos, FE: fosfatidiletanolamina, FC: fosfatidilcolina. Letras superíndices distintas en la misma línea muestran diferencias significativas con un intervalo de confianza de 95%.

4.2.3. Análisis de los ésteres metílicos de ácidos grasos mediante análisis de GC-MS

Los EMAG de AK y todas las FSP analizadas por GC-MS se muestran en la Tabla 3.8.

El AK mostró un contenido total de AGS aproximadamente de un 37%, siendo los AG mayoritarios C14:0 y C16:0. El contenido en AGMI fue de un 26% con un 11% de ácido oleico (C18:1 c9 OA) y un 8% de C18:1 c11+c13 como AG mayoritarios de este grupo. En cuanto al contenido en AGPI, alcanzó un 32% con valores de EPA y DHA del 18% y 8% respectivamente. Estos resultados son concordantes con los obtenidos por Ju y Harvey (2004) y Araujo *et al.*, (2014), que reportaron valores de 33% y 38% de AGS, 25% y 24% de AGMI, y 38% de AGPI respectivamente. En la Tabla 3.8. se puede observar un incremento significativo en los valores totales de AGPI, principalmente compuesto por EPA y DHA, con las temperaturas más frías, particularmente a -20 y -35°C, (Figura 3.7.).

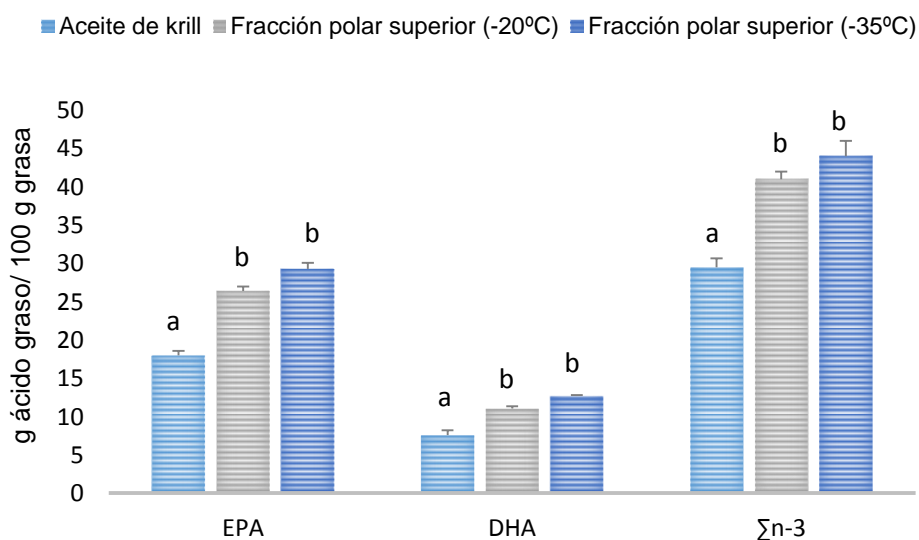


Figura 3.7. Porcentaje (g ácido graso/100g grasa) de aceite de krill y las fracciones superiores polares a -20°C y -35°C tras 24h. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

CAPÍTULO III

Tabla 3.8. Composición en AG (% p/p) de aceite de krill (AK) y fracciones polares (FSP) a 20°C, 4°C, -20°C y -35°C tras 24h y 48h de incubación mediante análisis de GC-MS.

EMAG (%)	AK	20°C 24h		4°C 24h		4°C 48h		-20°C 24h		-20°C 48h		-35°C 24h		-35°C 48h	
	Media ± DE	Media ± DE		Media ± DE	Media ± DE	Media ± DE	Media ± DE	Media ± DE	Media ± DE	Media ± DE	Media ± DE	Media ± DE	Media ± DE	Media ± DE	Media ± DE
C14	12,23 ± 0,38 a	10,17 ± 0,89 b		9,46 ± 0,31 b	9,35 ± 0,08 b	7,17 ± 0,39 c	6,14 ± 0,16 d	6,09 ± 0,48 d,e	5,30 ± 0,28 e						
C15	0,45 ± 0,01 a	0,38 ± 0,02 b		0,38 ± 0,01 b	0,38 ± 0,01 b	0,35 ± 0,01 c	0,31 ± 0,01 d	0,34 ± 0,02 c,d	0,33 ± 0,01 c,d						
C16	23,42 ± 0,61	23,87 ± 0,82		24,54 ± 0,61	24,80 ± 0,45	25,01 ± 0,62	23,55 ± 0,81	23,79 ± 1,18	23,65 ± 0,86						
C16:1	5,64 ± 0,15 a	4,59 ± 0,21 b		4,38 ± 0,04 b	4,35 ± 0,01 b	3,80 ± 0,08 c	3,43 ± 0,07 d	3,51 ± 0,23 c,d	3,31 ± 0,15 d						
C18	1,12 ± 0,01 a	0,84 ± 0,12 b		0,87 ± 0,04 b	0,88 ± 0,02 b	0,83 ± 0,01 b	0,71 ± 0,05 c	0,81 ± 0,04 b	0,77 ± 0,01 b,c						
C18:1 c9 n9	11,48 ± 0,17 a	8,61 ± 0,34 b		8,50 ± 0,22 b	8,40 ± 0,14 b	7,82 ± 0,23 c	6,88 ± 0,40 d	7,36 ± 0,26 d	6,94 ± 0,12 e						
C18:1 c11+13	7,80 ± 0,07 a	6,92 ± 0,45 b		7,07 ± 0,21 b	7,07 ± 0,12 b	7,37 ± 0,13 b	6,88 ± 0,37 b	7,28 ± 0,17 b	7,26 ± 0,11 b						
C18:2 n6	2,13 ± 0,02 a	1,93 ± 0,17 a,b		1,98 ± 0,04 b	1,95 ± 0,03 b	1,99 ± 0,04 b	1,88 ± 0,09 b	2,09 ± 0,03 a	2,15 ± 0,04 a						
C18:3 n3	1,45 ± 0,05 a	1,47 ± 0,08 a		1,46 ± 0,06 a	1,46 ± 0,03 a	1,50 ± 0,08 a	1,48 ± 0,10 a	1,65 ± 0,02 b	1,69 ± 0,07 b						
C20:1 c9	0,64 ± 0,04 a	0,40 ± 0,12 b		0,43 ± 0,04 b,c	0,40 ± 0,04 b,c	0,44 ± 0,03 b,c	0,38 ± 0,05 c	0,47 ± 0,02 b	0,52 ± 0,03 a,b						
C18:4 n3	2,46 ± 0,05 a	2,33 ± 0,25 a,b		2,18 ± 0,10 b	2,15 ± 0,07 b	2,05 ± 0,10 b	2,20 ± 0,16 b	2,11 ± 0,08 b	1,62 ± 0,91 a,b						
C22:1 n9	0,52 ± 0,05 a	0,57 ± 0,14 a,b		0,62 ± 0,06 a,b	0,63 ± 0,04 b	0,74 ± 0,01 c	0,69 ± 0,09 b,c,d	0,84 ± 0,07 d	0,87 ± 0,08 d						
C20:4 AA n6	0,36 ± 0,02 a	0,43 ± 0,06 a,b,c		0,46 ± 0,01 b	0,46 ± 0,00 b	0,52 ± 0,02 c	0,53 ± 0,03 c,d	0,58 ± 0,03 d,e	0,62 ± 0,03 e						
C20:5 EPA n3	17,98 ± 0,59 a	24,08 ± 1,43 b		24,41 ± 0,88 b	24,44 ± 0,53 b	26,40 ± 0,56 b,d	29,75 ± 1,59 c	28,08 ± 1,12 c,d	29,31 ± 0,75 c						
C22:6 DHA n3	7,58 ± 0,58 a	9,87 ± 0,12 b		10,15 ± 0,21 b,c	10,09 ± 0,07 c	11,04 ± 0,31 d,f	12,31 ± 0,29 e,f	12,06 ± 0,93 f	12,70 ± 0,79 e						
Σn.i.	4,73 ± 0,09 a	3,55 ± 0,11 b		3,11 ± 0,39 b,c,d	3,18 ± 0,16 b,c	2,98 ± 0,10 c,d	2,88 ± 0,02 d	2,94 ± 0,35 b	2,95 ± 0,11 b						
ΣAGS	37,22 ± 1,00 a	35,26 ± 0,60 b		35,25 ± 0,66 b	35,29 ± 0,56 b	33,35 ± 1,00 c	30,72 ± 0,99 d	31,04 ± 1,58 d,c	30,06 ± 1,13 d						
ΣAGMI	26,08 ± 0,27 a	21,08 ± 0,85 b		20,99 ± 0,49 b	20,80 ± 0,35 b	20,16 ± 0,41 b,d	18,27 ± 0,96 c	19,45 ± 0,55 c,d	18,90 ± 0,26 c						
ΣAGPI	31,96 ± 1,17 a	40,11 ± 1,30 b		40,65 ± 1,11 b	40,48 ± 0,67 b	43,50 ± 1,06 c	48,14 ± 1,82 d	46,57 ± 2,00 d	48,09 ± 1,07 d						
ΣAGPI n3	29,47 ± 1,15 a	37,75 ± 1,49 b		38,21 ± 1,15 b	38,10 ± 0,70 b	40,99 ± 1,00 c	45,73 ± 1,89 d	43,90 ± 2,00 c,d	45,32 ± 1,06 d						
ΣAGPI n6	2,50 ± 0,02 a	2,36 ± 0,23 a,b		2,44 ± 0,04 a,b	2,40 ± 0,03 b	2,50 ± 0,06 a,b	2,41 ± 0,12 a,b	2,67 ± 0,01 c	2,78 ± 0,05 d						
AGS/AGMI	1,50 ± 0,03 a	1,74 ± 0,08 b		1,75 ± 0,04 b	1,76 ± 0,00 b	1,72 ± 0,04 b	1,75 ± 0,07 b	1,68 ± 0,05 b	1,67 ± 0,04 b						
AGS/AGPI	1,22 ± 0,08 a	0,91 ± 0,04 b		0,90 ± 0,04 b	0,91 ± 0,03 b	0,80 ± 0,04 c	0,67 ± 0,04 d	0,70 ± 0,07 c,d	0,66 ± 0,04 d						
n6/n3	0,09 ± 0,01 a	0,07 ± 0,01 b		0,07 ± 0,01 b	0,07 ± 0,01 b	0,06 ± 0,01 c	0,06 ± 0,01 c	0,06 ± 0,01 c	0,06 ± 0,01 c						

AGS: ácidos grasos saturados, AGMI: ácidos grasos monoinsaturados, AGPI: ácidos grasos poliinsaturados, AA: ácido araquidónico, EPA: ácido eicosapentaenoico, DHA: ácido docosahexaenoico. Letras a la derecha distintas en la misma línea muestran diferencias significativas en un nivel de confianza de 95%.

En base a los resultados obtenidos de clases lipídicas mediante el análisis HPLC-ELSD (Tabla 3.6.), se sugiere que los AG EPA y DHA están posicionados preferentemente en las moléculas de FC y DG (Figura 3.8.).

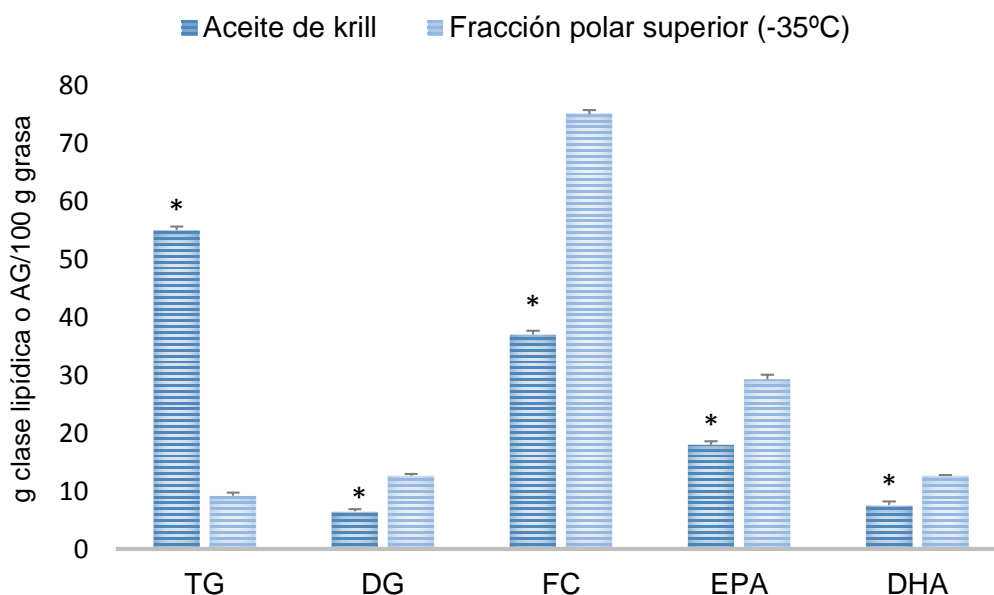


Figura 3.8. Porcentaje (g clase lipídica o ácido graso/100g grasa) de aceite de krill y la fracción superior polar a -35°C. Asteriscos indican diferencias significativas para una misma clase lipídica o ácido graso ($p<0.05$).

La presencia de una mayor concentración de estos AG n-3 en LP y DG en el AK ya había sido reportada por otros autores como Castro-Gómez *et al.* (2015), donde separaron tres fracciones con diferente grado de polaridad: F1-TG, F2- DG+AGL+Col y F3-LP. En este estudio, se mostró que el 35% de AGPI (principalmente EPA y DHA) del AK, se encuentran localizados en F2 y un 45% en F3. En esta misma línea, en el aislamiento de FC procedente de AK con acetona llevado a cabo por Zhao *et al.* (2014), se determinó la composición lipídica en EMAG del extracto, y se reportaron valores de 31.3% EPA y 14.5% DHA. Estos resultados son similares a los obtenidos en los tratamientos óptimos del presente estudio con, aproximadamente, un 30% de EPA y 12% DHA a temperaturas de congelación (-20°C y -35°C). En cuanto al tratamiento a diferentes temperaturas, se observó un comportamiento similar en una patente por Dueppen *et al.* (2008), quienes mediante el empleo de diferentes disolventes (hexano y acetona), obtuvieron una precipitación de TG a temperaturas inferiores a 0°C, por lo que se obtuvo una fase superior rica en ácidos grasos poliinsaturados de cadena muy larga (AGPICML) procedentes de semillas oleaginosas

y fuentes marinas. Por otro lado, el estudio llevado a cabo por López-Martínez *et al.*, (2004) también obtuvo una elevada concentración de AGPI en la cristalización del aceite de *Borago officinalis* tras un tratamiento a -70°C , superior al obtenido a 4°C . Otros estudios relacionados con la concentración de AGPICL por frío, son los llevados a cabo por Homayoony *et al.*, (2014), que concentraron AGPI procedente de aceite de sardina mediante el empleo de etanol entre 10°C , 0°C y -5°C , con el mayor rendimiento a la menor temperatura aplicada, con la obtención de un 17% de EPA y un 25% de DHA; así como Mendes *et al* (2006), que obtuvieron una concentración de DHA en *Crypthecodinium cohnii* de hasta el 99% mediante el empleo de complejos de urea, en una relación 3.5 urea/AG a una temperatura de cristalización de 4°C y 8°C . Los datos correspondientes de este estudio en un paso previo de winterización a -18°C (cristalización por frío) fueron de un incremento del 33% DHA al 41% DHA respecto a la composición inicial de AG. En la misma línea, Soleimanian *et al* (2015) emplearon diferentes métodos basados en la cristalización de aceite de pez linterna mediante el uso de temperaturas bajas, así como el número de cristalizaciones a diferente temperatura y velocidad de cristalización. El mayor extracto tan sólo obtuvo un 3% más de AGPI n-3, respecto a las concentraciones iniciales, con temperaturas de 5°C y 0°C . Este resultado mejoraba con la aplicación de una segunda cristalización rápida de 5°C a 0°C hasta obtener un contenido del 30% AGPI n3. Por otro lado, Letisse *et al* (2006) obtuvieron valores de 11% y 13% de EPA y DHA respectivamente en la extracción de aceite procedente de sardina mediante el empleo de SFE con un rendimiento en el extracto oleoso del 10% respecto al valor inicial. No obstante, los resultados obtenidos respecto a la extracción con disolventes no fueron tan destacados en cuanto al rendimiento, como la eficiencia de la tecnología y la mejora organoléptica del producto final. Las diferencias del contenido en AG con respecto al presente estudio, podrían ser debidas a las distintas condiciones de aplicación y la composición lipídica original. Como era de esperar, los cambios observados en la composición de EMAG debido a los diferentes tiempos y temperaturas, obtuvieron diferencias significativas ($p<0.05$) en la relación AGS/AGPI, aunque no fueron destacados en la relación AGS/AGMI y n-6/n-3. La relación AGS/AGPI fue menor significativamente en todos los ensayos realizados respecto al AK inicial, donde se obtuvieron las menores relaciones a -20°C durante 48h, y a -35°C durante 24 y 48h ($p<0.05$).

En base a los resultados obtenidos en las diferentes FSP del fraccionamiento de aceite de krill con etanol, se eligieron como condiciones óptimas para la cristalización del AK, la temperatura de -35°C durante las primeras 24h, al ser las condiciones con

las que se obtuvieron mayores rendimientos de LP, EPA y DHA en la FSP, sin el requerimiento de realizar un segundo fraccionamiento que supondría tiempos totales de 48h. De este modo, se escaló el experimento con el empleo de cantidades superiores de AK, a fin de obtener una mayor cantidad de aceite de krill enriquecido en LP (CAK), siguiendo las pautas del ensayo optimizado. La composición en clases lipídicas y EMAG de la FSP, se muestran en las Tablas 3.9a. y 3.9b.

Tabla 3.9a. (izquierda), g clase lipídica/100g grasa total del concentrado de aceite de krill escalado y Tabla 3.9b. (derecha), composición en ácidos grasos del concentrado de aceite de krill escalado.

g CL/ 100g suplemento	CAK		g EMAG/ 100g suplemento	CAK	
	media	DE		media	DE
EC	0,25 ± 0,06		C14	7,59 ± 0,16	
TG	30,67 ± 2,95		C14:1	0,30 ± 0,00	
DG	15,53 ± 0,62		C16	19,51 ± 0,39	
AGL+Col	1,56 ± 0,64		C16:1	4,99 ± 0,02	
MG	0,21 ± 0,03		C16:1t	1,46 ± 0,03	
ΣLP	51,78 ± 3,95		C17:1	0,34 ± 0,01	
FE	0,55 ± 0,13		C18	0,56 ± 0,05	
FC	99,45 ± 0,13		C18:1 c9	8,31 ± 0,14	
			C18:1 11c	7,72 ± 0,04	
			C18:2 n6	1,67 ± 0,03	
			C18:3 n3	1,14 ± 0,04	
			C20:1	0,29 ± 0,03	
			C18:4 n3	4,22 ± 0,03	
			C20:4 n6	0,41 ± 0,04	
			C20:5 n3	26,84 ± 0,06	
			C22:6 n3	10,44 ± 0,51	
			Σn.i.	0,99 ± 0,16	
			Σn-6	2,09 ± 0,07	
			Σn-3	42,64 ± 0,57	
			ΣAGm	2,22 ± 0,22	

CL: clases lipídicas, EC: ester de colesterol, TG: triglicéridos, DG: diglicéridos, AGL+Col: ácidos grasos libres+colesterol, MG: monoglicéridos, LP: lípidos polares, FE: fosfatidilcolina, FC: fosfatidiletanolamina,, EMAG: ésteres metílicos de ácidos grasos, n.i. no identificados, AGm: ácidos grasos minoritarios.

El incremento en la cantidad de AK en el fraccionamiento, a -35°C tras 24h, con la proporción 1:8 de AK/etanol, supuso un menor enriquecimiento en LP y AG EPA y DHA respecto al ensayo bajo las mismas condiciones, con menores cantidades de AK. Si bien, la composición del CAK en LP fue de un 52%, así como un 27% de EPA y 11% de DHA, respecto a la composición del AK, con un 37%, 18% y 8% respectivamente.

5. CONCLUSIONES PARCIALES

En conclusión, se han desarrollado dos métodos de enriquecimiento en lípidos polares mediante el empleo de disolventes GRAS, con procesos sencillos, escalables y económicos. Por un lado, un producto procedente de Mz enriquecido en LP, basado en la precipitación de la fracción insoluble en acetona. Los mejores resultados obtuvieron un rendimiento aproximado del 90% en LP con dos extracciones consecutivas en una relación 1:5 y 1:2 a una temperatura de 20°C. Un segundo producto rico en EPA y DHA incorporados en DG y, principalmente LP, mediante el empleo de etanol y bajas temperaturas (-20°C y, en particular, -35°C) durante 24 h. Estas características llevan a considerar estos métodos como una buena alternativa para la obtención de un potencial ingrediente funcional procedente de la Mz y el AK.

4. BIODISPONIBILIDAD DE CONCENTRADOS RICOS EN
LÍPIDOS POLARES DE MAZADA Y KRILL

CAPÍTULO IV. ESTUDIO PILOTO DE LA BIODISPONIBILIDAD DE CONCENTRADOS RICOS EN LÍPIDOS POLARES DE MAZADA Y KRILL EN RATAS

1. INTRODUCCIÓN

Como ya se ha indicado anteriormente, se considera de gran importancia disponer de alimentos enriquecidos en LP tanto a nivel tecnológico, debido a la funcionalidad que pueden aportar, como a nivel funcional por sus interesantes beneficios en la salud humana en la prevención o mejora del pronóstico de enfermedades cardiovasculares, hepáticas, degenerativas, procesos cancerígenos, etc. A pesar de ello, no se han encontrado muchas investigaciones en las que se estudie la digestibilidad y posterior biodisponibilidad de productos ricos en LP.

De este modo, en el presente capítulo se ha investigado la biodisponibilidad de los distintos productos enriquecidos en LP: CMz y CAK, para obtener un mayor conocimiento de la presencia y farmacocinética de los compuestos de interés en plasma, así como establecer posibles diferencias que puedan producirse por el efecto de la matriz y composición de cada uno de los concentrados enriquecidos en LP.

2. OBJETIVOS

En base a lo anteriormente descrito, el objetivo de este capítulo fue evaluar la biodisponibilidad de concentrados ricos en lípidos polares obtenidos de diferentes fuentes, krill y mazada, mediante el estudio de la composición de lípidos del plasma de ratas a diferentes tiempos tras una única ingesta de los concentrados.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Animales y diseño experimental

Se emplearon ratas adultas Wistar macho con un peso entre 240-270 g. Los animales se mantuvieron en jaulas individuales con camas de serrín en habitaciones con condiciones ambientales controladas ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$ y $50\pm 10\%$ humedad relativa) con un ciclo de 12h de luz/oscuridad (luz desde las 08.00h hasta las 20.00h). Las ratas fueron alimentadas durante los 15 días anteriores al sacrificio con pienso EURodent Diet 22% (LabDiet), del que fueron privadas 12h antes de administración de los concentrados en LP (CMz y CAK), y agua potable *ad libitum*. En total, se asignaron de manera aleatoria 20 ratas en 2 grupos para cada uno de los concentrados evaluados con 1 duplicado en cada tiempo tras la ingesta del complemento ($n=2/\text{tiempo}$). La dosis empleada de CAK y CMz, fue de 3000mg/kg rata y 5000mg/kg rata respectivamente, en función de la cantidad LP de cada concentrado, para asegurar una concentración suficiente de los compuestos administrados en plasma, superiores al límite de cuantificación de los métodos de análisis. Los animales se sacrificaron por dislocación cervical a las 0h, 30min, 1h, 4h y 8h tras la ingesta del complemento. Las muestras de sangre fueron recolectadas en tubos con heparina. El plasma fue separado de los eritrocitos por centrifugación y se mantuvo a -80°C hasta su análisis.

3.2. Extracción de lípidos plasmáticos

La extracción de la grasa del plasma se realizó con el método Folch descrito por Löfgren *et al.* (2012) con ligeras modificaciones. Brevemente, un volumen de 1.50 mL de plasma se disolvió en 3.32 mL de metanol en tubos de 50mL de vidrio. La mezcla se sonicó con un procesador de ultrasonidos (Dr. Hielscher, Teltow, Alemania) durante dos ciclos de 15 segundos, posteriormente se añadieron 6.64 mL de diclorometano y la mezcla se mantuvo durante 20 min en agitación en orbital. Se añadieron 2 mL de ácido acético 20mM y de nuevo se agitó la muestra durante 20 min. Posteriormente, se centrifugó a 2100 rpm, 5 min a 4°C . La fase orgánica inferior se transfirió a un nuevo tubo con pipeta Pasteur y la fase acuosa (fase superior) se lavó con 3.32 mL de diclorometano nuevamente y se mantuvo en agitación 10 min hasta su centrifugación bajo las mismas condiciones anteriormente descritas. De nuevo, la segunda fase orgánica se recolectó en el mismo tubo que la anterior. Finalmente se filtró por filtro de $0.45\mu\text{m}$ con la ayuda de una jeringa de vidrio, se evaporó con corriente de nitrógeno y

se pesó el contenido de grasa obtenido. Los extractos lipídicos se mantuvieron a -35°C hasta su análisis.

3.3. Composición de las clases lipídicas presentes en cada una de las muestras, analizadas mediante HPLC-ELSD

La metodología empleada ha sido descrita con detalle en el apartado “3.5.” del CAPÍTULO III.

3.5. Composición en ácidos grasos por CG-MS

La metodología empleada ha sido descrita con detalle en el apartado “3.6.” del CAPÍTULO III.

3.3. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante un análisis de varianza (ANOVA) con el empleo del test de Bonferroni como estudio post-hoc. El programa utilizado para ello fue el paquete SPSS (SPSS 22.0 for Windows, SPSS inc. IBM, Armark, Nueva York, EEUU). El nivel de significancia se fijó en 95%.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Contenido en lípidos plasmáticos

El contenido en lípidos totales del plasma de los animales suplementados con CMz o CAK se muestra en la Tabla 4.1. El valor promedio de extracción fue aproximadamente 0.35%. No se observaron diferencias significativas en el contenido graso entre los distintos tiempos tras la ingesta de los concentrados, así como tampoco en el contenido graso de los plasmas de los animales alimentados con CAK o CMz.

Tabla 4.1. Contenido graso del plasma extraído de las ratas en cada tiempo de sacrificio (g grasa/100 mL plasma).

Tiempo (min)	CAK		CMz	
	Media	DE	Media	DE
0	0,31 ± 0,02		0,51 ± 0,20	
30	0,30 ± 0,06		0,32 ± 0,03	
60	0,38 ± 0,04		0,35 ± 0,03	
240	0,54 ± 0,16		0,31 ± 0,01	
480	0,28 ± 0,06		0,34 ± 0,05	

CAK: concentrado de aceite de krill, CMz: concentrado de grasa de mazada

Colina-Coca *et al.* (2014), realizaron un estudio en el que investigaron el efecto de cebolla como ingrediente funcional en dietas hipercolesterolémicas en ratas Wistar macho de peso similar al del presente estudio, en el que obtuvieron contenidos grasos similares de plasma con ~0.5g grasa/100 mL plasma. Por otra parte, valores parecidos en el contenido graso del plasma, también fueron reportados por Yu-Hong *et al* (2016) en ratas de distinto género suplementadas con AG n-3, obteniendo contenidos plasmáticos de grasa, de aproximadamente, 0.4-0.6%.

4.2. Análisis de la composición lipídica plasmática

4.2.1. Análisis de clases lipídicas mediante HPLC-ELSD

La composición en clases lipídicas de los plasmas de los animales a los que se les administraron ambos concentrados ricos en LP, así como de los propios concentrados, se detalla en las Tablas 4.2a. (CMz) y 4.2b. (CAK).

La distribución de las clases lipídicas del plasma de los animales mostró diferentes contenidos de las clases lipídicas analizadas en función del producto rico en LP administrado. Así, en el plasma de los animales que consumieron CMz, las clases lipídicas mayoritarias fueron EC, FC y TG, sin embargo, en la composición plasmática de los animales que consumieron CAK, los mayores porcentajes plasmáticos se obtuvieron en Col, DG y FC (Figura 4.1.). Estas variaciones podrían estar relacionadas con los resultados expuestos por Agren *et al.* (2006). En el estudio que desarrollaron, mostraron diferentes concentraciones plasmáticas iniciales en la composición de las lipoproteínas VLDL en las clases lipídicas EC, TG, Col libre, FC y EM en función de la capacidad de absorción de Col de individuos que separaron en: individuos con elevada absorción de colesterol e individuos con baja absorción de colesterol. Así, en los individuos con menor capacidad de absorción de Col de la dieta, los valores a tiempo 0

h de EC, TG, Col libre, FC y EM partieron de mayor concentración que los obtenidos en los individuos con mayor absorción de Col. Este comportamiento podría relacionarse con los resultados observados en el presente estudio, respecto a la composición plasmática de EC, TG y FC de los animales que consumieron CMz, cuyo contenido en Col es inferior al 0.1% de Col, respecto a la composición del CAK, con un 1.6% de Col (Tabla 4.2.). Por otro lado, el menor contenido plasmático en TG de los animales a los que se les administró CAK en los tiempos evaluados, podría estar relacionado con el contenido en AGPICL n3 del CAK. Kimura *et al.*, (2013) reportaron menores concentraciones plasmáticas de TG en ratas, cuando éstas consumían DHA a diferentes dosis (1.9% y 3.7% de DHA). Si bien, aunque se observó una menor concentración de TG plasmáticos con la complementación de DHA en las dosis empleadas, la diferencia fue significativa sólo con el aporte de un 3.7% de DHA, en la comparación de esta clase lipídica con el consumo de una dieta control, compuesta por aceite de oliva.

Tabla 4.2a (arriba) y 4.2b (abajo). Composición en clases lipídicas del plasma de animales a los que se les administró concentrado en lípidos polares de mazada y krill, respectivamente (g clase lipídica/100 g grasa)

Clase lipídica (%)	CMz	CMz					
		0 h	0,5 h	1 h	4 h	8 h	
EC	<0,1 -	47,80 ± 8,52 a	35,87 ± 1,38 a	26,27 ± 1,87 b	27,92 ± 0,38	22,72 ± 3,69 b	
TG	8,61 ± 3,05	18,29 ± 5,30 a	30,35 ± 3,71 a	40,40 ± 1,99 b	33,92 ± 1,53	39,00 ± 4,82 b	
DG	0,59 ± 0,14	1,07 ± 0,63	2,88 ± 0,99	5,25 ± 1,14	1,83 ± 0,09	3,04 ± 1,16	
AGL+Col	<0,1 -	3,90 ± 0,49	4,14 ± 0,16	5,24 ± 1,70	4,45 ± 0,33	5,49 ± 0,02	
MG	0,20 ± 0,10	0,07 ± 0,03	0,06 ± 0,02	0,20 ± 0,08	0,04 ± 0,00	0,06 ± 0,01	
FE	14,15 ± 1,02	0,10 ± 0,05	0,15 ± 0,14	0,11 ± 0,13	0,11 ± 0,05	0,08 ± 0,03	
FI	1,21 ± 0,05	1,25 ± 0,61	1,30 ± 0,06	0,85 ± 0,11	1,38 ± 0,18	1,26 ± 0,20	
FC	35,73 ± 1,57	25,45 ± 1,49	23,45 ± 3,24	20,40 ± 1,09	28,83 ± 0,88	26,47 ± 2,70	
EM	23,32 ± 0,43	2,06 ± 0,08	1,78 ± 0,35	1,29 ± 0,09	1,52 ± 0,07	1,89 ± 0,21	
ΣPL	86,83 ± 3,27	28,86 ± 2,07	26,69 ± 3,50	22,65 ± 0,94	31,84 ± 0,73	29,69 ± 2,26	

Clase lipídica (%)	CAK	CAK					
		0 h	0,5 h	1 h	4 h	8 h	
EC	0,25 ± 0,06	9,87 ± 0,19	15,34 ± 0,01	15,06 ± 4,32	12,88 ± 2,99	11,08 ± 2,69	
TG	30,67 ± 2,95	2,33 ± 1,34	13,66 ± 14,45	27,48 ± 5,79	15,75 ± 0,48	6,23 ± 2,19	
DG	15,53 ± 0,62	18,76 ± 3,00	19,57 ± 1,07	19,38 ± 3,09	17,55 ± 1,36	15,43 ± 1,55	
AGL+Col	1,56 ± 0,64	47,62 ± 2,52	30,89 ± 11,94	22,18 ± 5,60	31,69 ± 2,23	38,73 ± 3,15	
MG	0,21 ± 0,03	5,25 ± 0,81	2,73 ± 0,43 a	2,26 ± 1,13 a	4,65 ± 0,17	6,52 ± 0,66 b	
FE	<0,1 -	-	-	-	-	-	
FI	-	1,63 ± 0,05	1,46 ± 0,13	0,56 ± 0,03 a	1,24 ± 0,20	1,97 ± 0,39 b	
FC	51,78 ± 3,94	12,01 ± 0,45 a	14,21 ± 1,85	12,14 ± 0,38 a	14,60 ± 0,40	17,53 ± 0,87 b	
EM	<0,1 ± -	2,52 ± 0,32	2,14 ± 1,17	0,95 ± 0,05	1,64 ± 0,09	2,51 ± 0,01	
ΣPL	51,78 ± 3,95	16,17 ± 0,82	17,81 ± 3,16	13,64 ± 0,29	17,48 ± 0,29	22,01 ± 0,49	

Primera columna (valores): composición lipídica de ambos concentrados. EC: éster de colesterol, TG: triglicéridos, DG: diglicéridos, AGL+Col: ácidos grasos libres y colesterol, MG: monoglicéridos, FE: fosfatidiletanolamina, FI: fosfatidilinositol, FC: fosfatidilcolina, EM: esfingomielina, LP: lípidos polares, CMz: concentrado de grasa de mazada, CAK: concentrado de aceite de krill. Letras superíndices diferentes muestran diferencias significativas en un intervalo de confianza de 95%.

Por otro lado, como se puede observar en la Tabla 4.2., en los plasmas de los dos grupos de animales, se encuentran todas las clases lipídicas, exceptuando la FE, que no detectó en la composición plasmática del grupo alimentado con CAK, y la FS, que no se observó en el plasma de ninguno de los grupos estudiados, probablemente por estar en cantidades inferiores al límite de detección, ya en se encuentran en concentraciones minoritarias en plasma (Nestel *et al.*, 2013, El-Ansary *et al.*, 2011).

Respecto a la composición lipídica plasmática de los animales a los que se les administró CMz, a pesar de tener un 26.7% de EM sobre el total de LP en el concentrado (Tabla 4.2.), se observaron valores similares a los obtenidos en la composición plasmática del grupo administrado con CAK (sin aporte de EM en este producto). Así, los valores iniciales de EM en plasma del grupo que ingirió CMz fueron de $1.8\% \pm 0.4$ y de $2.14\% \pm 1.17$ en el plasma del grupo al que se administró CAK. Este hecho, puede deberse a una diferente reesterificación de los AG procedentes de los LP de la dieta en el enterocito. Así, cuando se produce la lipólisis de los AG en el lumen intestinal, éstos puede reesterificarse en los enterocitos a TG, o a LP (Cohn *et al.*, 2010), por lo que no se produciría una relación directa en el incremento de la cantidad de LP de la dieta.

En cuanto a los DG y MG, se observó un mayor porcentaje en la composición plasmática de los animales que ingirieron CAK que en el plasma de los que consumieron CMz, donde además no se mostraron diferencias entre los tiempos estudiados tras la ingesta ($p < 0.05$). Esta mayor biodisponibilidad en plasma de DG y MG en el grupo suplementado con CAK, podría estar relacionada con una proporción mayor de estas clases lipídicas en el producto administrado (Tabla 4.2.). Un comportamiento similar se pudo observar en la composición de FE de ambos animales. En el grupo que consumió CAK ($< 0.2\%$ FE en el producto), no se detectó FE en ningún tiempo evaluado tras la ingesta, sin embargo, tras la administración de CMz, cuyo contenido en FE es del 15% sobre el total de LP, se pudo cuantificar este FL en todos los tiempos estudiados ($< 0.2\text{g FE}/100\text{g grasa}$ tras 0, 0.5, 1, 4 y 8h) (Tabla 4.2.).

CAPÍTULO IV

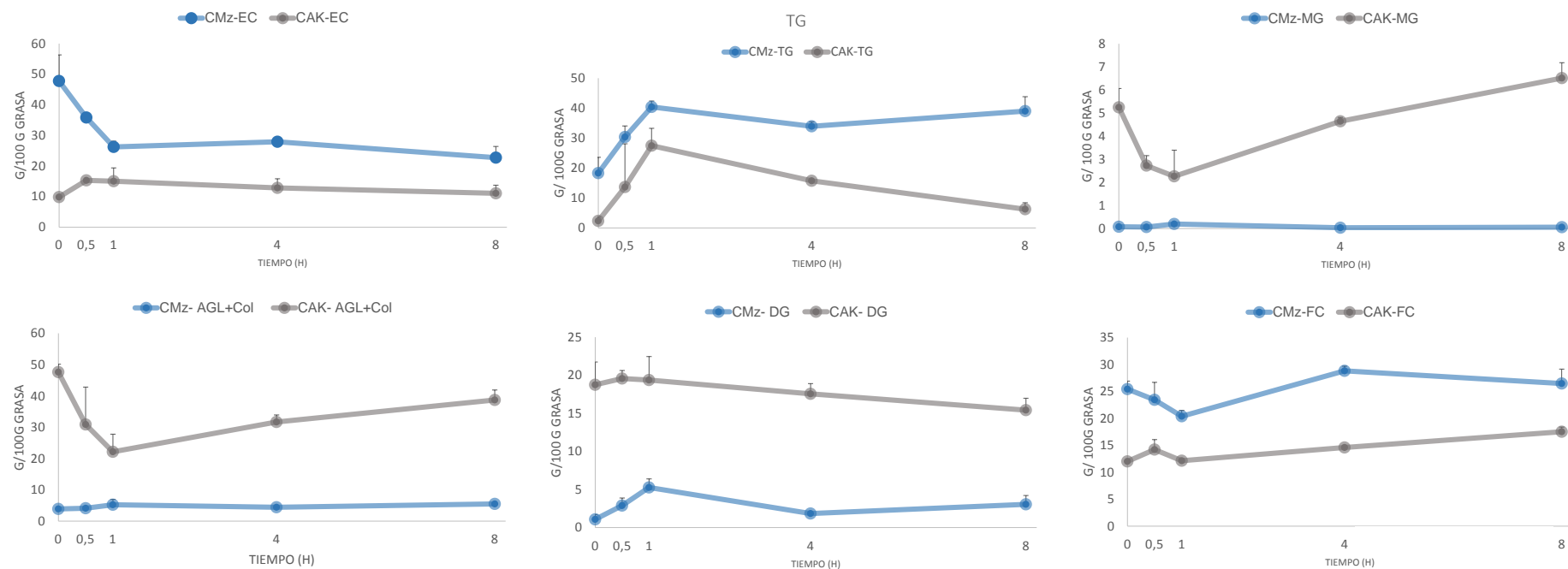


Figura 4.1. Evolución de EC: éster de colesterol, TG: triglicéridos, MG: monoglicéridos, AGL+Col: ácidos grasos libres y colesterol, DG: diglicéridos, FC: fosfatidilcolina expresado en porcentaje de grasa en plasma (g clase lipídica/ 100g grasa). Las diferencias significativas no se muestran en la Figura 4.1.

En cuanto al tiempo en el que se obtiene la máxima absorción en plasma, los TG de ambos grupos tuvieron su máximo valor tras 1h posterior a la ingesta de cada dosis. Aunque en los animales que tomaron CAK no se encontraron diferencias significativas, sí siguieron la misma tendencia que los que consumieron CMz, que presentaron mayores contenidos en TG plasmáticos tras 1h de la ingesta del concentrado ($p<0.05$) (Figura 4.1.). Del mismo modo, Lecomte *et al.*, (2015) observaron en ratones suplementados con un ingrediente rico en lípidos polares de origen lácteo o de soja, que la mayor concentración plasmática de TG se producía a 1h tras la ingesta. Resultados similares, fueron los obtenidos por Rodríguez-Alcalá *et al* (2015), en el estudio que llevaron a cabo con la administración de grasa de leche de cabra, cuya composición principal está compuesta por TG, enriquecida en AG vaccénico, linoleico conjugado y AAL en ratas Wistar macho. En el estudio mencionado reportaron los mayores tiempos de absorción de ácido vaccénico, ácido linoleico conjugado y AAL, a las 2h tras la ingesta.

Por otro lado, los MG presentes en el plasma de los animales que consumieron el CAK, mostraron el mayor contenido en plasma tras 8h después de la administración de la dosis. Esta evolución en plasma podría estar relacionada con la acción de la enzima lipoprotein lipasa, encargada de hidrolizar TG a AG en los quilomicrones, para que sean absorbidos en los tejidos, por lo que en la actividad de la enzima, se incrementa la concentración de DG y MG por la hidrólisis de los TG hasta obtener los AGL disponibles para las células de los tejidos de destino (Michalski, 2009; Voshol *et al.*, 2000).

El contenido en EC plasmático de los animales que consumieron la dosis de CMz, mostró una disminución inversamente proporcional a la observada en el incremento de TG del mismo grupo (Tabla 4.2.). Así, tras 1h del consumo de CMz, disminuyeron los niveles de EC y se mantuvieron hasta las 8h (Figura 4.2.).

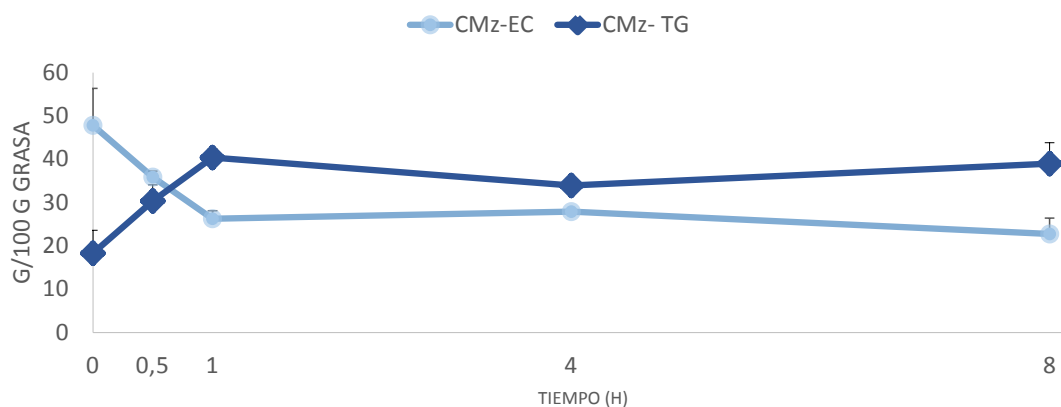


Figura 4.2. Evolución de EC: éster de colesterol, y TG: triglicéridos del concentrado de lípidos polares de mazada (CMz).

En esta relación inversa estaría directamente involucrada la proteína de transferencia de éster de colesterol (CETP –cholesteryl ester transfer protein), cuya actividad se basa en la transferencia de TG y EC entre lipoproteínas, mediando la transferencia de EC de las HDL y TG de las VLDL y LDL, y viceversa (Alssema *et al.*, 2007). Así, se ha reportado que el aumento postprandial de TG plasmáticos, está directamente relacionado con el aumento de la actividad de la CETP hacia la vía de generación de TG (Bellanger *et al.*, 2012).

En cuanto a la FC, tras 8h de la administración del CAK, se observó el mayor valor de biodisponibilidad en plasma, sin embargo, este comportamiento no se pudo observar tras el consumo de CMz al no mostrar diferencias entre los tiempos estudiados (Figura 4.1.). No obstante, en ambos grupos, a partir de 4h de la ingesta, se observó una tendencia en el incremento del contenido plasmático en FC. En esta línea, cabe mencionar un estudio publicado por Martínez-Beamonte *et al.*, (2013), en el que observaron un incremento en la concentración de FL en plasma de ratas a las 8h tras haber consumido 5mL de aceite de oliva virgen, que no posee LP en su composición. Este hecho, lleva a suponer que la variación de la concentración de LP en plasma tras la ingesta, no tiene una relación directa con el consumo de LP, sino también un efecto que no estaría relacionado con el consumo de fuentes con aporte en LP.

3.2. Análisis los ésteres metílicos de los ácidos grasos mediante GC-MS

La distribución de los EMAG plasmáticos de los animales a los que se les administraron los concentrados ricos en lípidos polares, se detalla en la Tabla 4.3a. (CMz) y 4.3b. (CAK). Los AG grasos mayoritarios observados en la composición plasmática de los animales fueron C16:0, C18:0, C18:1 n-9, C18:2 n-6 y C20:4 (AA). Estos resultados están de acuerdo con el perfil de AG plasmáticos en ratas observado por otros autores, que presentaron los mismos ácidos grasos que se muestran en el presente estudio (Yu-Hong *et al.*, 2016; Vigerust *et al.*, 2013).

Tabla 4.3a (arriba) y 4.3b. (abajo). Composición en EMAG del plasma de animales que consumieron concentrado rico en lípidos polares de mazada y krill respectivamente (g clase lipídica/100 g grasa).

(g EMAG/ 100g grasa)	CMz		CMz									
			0 h		0,5 h		1 h		4 h		8 h	
			Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE
C14:0	6,23 ± 0,29		0,68 ± 0,22		0,46 ± 0,03	a	1,12 ± 0,01		1,32 ± 0,07	b	0,59 ± 0,25	
C14:1	0,89 ± 0,03		-		0,01 ± 0,01		0,04 ± 0,01		0,02 ± 0,01		0,01 ± 0,01	
C15:0	0,39 ± 0,02		0,40 ± 0,01		0,37 ± 0,06		0,34 ± 0,01		0,37 ± 0,04		0,35 ± 0,02	
C16:0	26,70 ± 0,53		23,43 ± 0,97		21,72 ± 0,36		23,86 ± 0,01		25,05 ± 1,58		25,12 ± 2,13	
C16:1t	-		0,31 ± 0,03		0,29 ± 0,06		0,24 ± 0,01		0,18 ± 0,02		0,22 ± 0,02	
C16:1	1,62 ± 0,03		1,44 ± 0,08		1,99 ± 0,16		2,38 ± 0,01	a	1,63 ± 0,11		1,32 ± 0,43	b
C17:0	-		0,23 ± 0,05		0,22 ± 0,03		0,19 ± 0,01		0,29 ± 0,03		0,27 ± 0,07	
C17:1	-		0,00 ± 0,00		0,03 ± 0,01		0,03 ± 0,01		0,03 ± 0,01		0,01 ± 0,01	
C18:0	11,63 ± 0,03		9,20 ± 0,72		6,78 ± 0,65		6,67 ± 0,01		9,00 ± 0,44		8,75 ± 1,63	
C18:1 trans	0,92 ± 0,02		0,37 ± 0,05	a	0,21 ± 0,00	b	0,23 ± 0,02		0,21 ± 0,01	a	0,20 ± 0,04	b
C18:1 n9	34,16 ± 0,59		9,38 ± 1,46	a	14,14 ± 1,46	b	16,50 ± 0,04	b	15,60 ± 0,38	b	13,81 ± 0,29	b
C18:1 cis	0,87 ± 0,03		2,04 ± 0,26	a	3,09 ± 0,09	b	2,42 ± 0,01		2,11 ± 0,23	a	2,03 ± 0,02	a
C18:2n6	8,67 ± 0,38		19,15 ± 5,33		24,84 ± 0,65		24,25 ± 0,04		22,05 ± 1,31		24,52 ± 1,36	
C18:3 n3	0,61 ± 0,04		0,43 ± 0,03		1,06 ± 0,03		0,97 ± 0,04		0,85 ± 0,13		0,91 ± 0,27	
C18:2 (CLA)	0,65 ± 0,04		-	a	0,04 ± 0,03	b	0,06 ± 0,01	b	0,08 ± 0,03	b	-	a
C20:4 n-6	0,89 ± 0,06		30,77 ± 6,14		22,50 ± 1,13		18,59 ± 0,01		19,81 ± 2,70		20,22 ± 2,26	
c20:5	-		0,48 ± 0,01		0,56 ± 0,10		0,85 ± 0,06	a	0,43 ± 0,08		0,49 ± 0,10	b
c22:6	-		1,70 ± 0,36		1,74 ± 0,17		1,33 ± 0,04		1,06 ± 0,34		1,19 ± 0,50	
Total (µg/mL)	-		1441,8 ± 875,5		2469,3 ± 786,1		2475,9 ± 196,4		1543,6 ± 138,2		1910,5 ± 793,4	

(g EMAG/ 100g grasa)	CAK		CAK									
			0 h		0,5 h		1 h		4 h		8 h	
			Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE
C14:0	7,59 ± 0,16		1,41 ± 0,32	a	0,77 ± 0,29	a	4,71 ± 0,46	b	2,07 ± 0,08	b	1,22 ± 0,34	
C14:1	0,30 ± 0,01		-		-		0,09 ± 0,01		0,04 ± 0,01		-	
C15:0	-		0,66 ± 0,10		0,50 ± 0,26		0,48 ± 0,07		0,41 ± 0,05		0,61 ± 0,17	
C16:0	19,51 ± 0,39		42,15 ± 0,40		34,40 ± 2,52		26,70 ± 0,20		29,09 ± 0,13		39,73 ± 4,90	
C16:1t	1,46 ± 0,03		0,51 ± 0,07		0,44 ± 0,20		0,41 ± 0,11		0,26 ± 0,06		0,35 ± 0,14	
C16:1	4,99 ± 0,02		2,47 ± 0,16	a,c	2,17 ± 0,27	a,c	4,44 ± 0,07	b	3,14 ± 0,34	c	2,21 ± 0,05	a
C17:0	-		0,53 ± 0,04		0,35 ± 0,15		0,25 ± 0,04		0,31 ± 0,04		0,47 ± 0,02	
C17:1	0,34 ± 0,01		0,23 ± 0,01		0,10 ± 0,09		0,08 ± 0,01		0,03 ± 0,00		0,00 ± 0,00	
C18:0	0,56 ± 0,05		18,62 ± 1,12		11,98 ± 3,28		5,98 ± 0,70		8,34 ± 0,17		15,13 ± 1,19	
C18:1 trans	-		0,51 ± 0,17		0,25 ± 0,08		0,13 ± 0,01		0,22 ± 0,02		0,32 ± 0,21	
C18:1 n9	8,31 ± 0,14		16,22 ± 0,76		17,94 ± 0,56		19,01 ± 3,42		17,28 ± 1,14		16,88 ± 0,75	
C18:1 cis	7,72 ± 0,04		4,18 ± 0,21		3,17 ± 0,80	a	5,45 ± 0,41	b	4,73 ± 0,47		4,38 ± 0,33	
C18:2n6	1,67 ± 0,03		10,32 ± 1,03		20,17 ± 2,91		20,75 ± 1,66		18,42 ± 0,43		13,06 ± 3,39	
C18:3 n3	1,14 ± 0,04		-		0,41 ± 0,40		0,74 ± 0,04		0,90 ± 0,06		0,07 ± 0,10	
C18:2 (CLA)	-		-		-		-		-		-	
C20:4 n-6	0,41 ± 0,04		2,19 ± 0,76		6,98 ± 3,23		7,62 ± 2,97		8,44 ± 0,49		4,66 ± 3,79	
C20:5	26,84 ± 0,06		-		0,09 ± 0,13	a	2,10 ± 0,87		4,90 ± 1,01	b	0,75 ± 0,60	
C22:6	10,44 ± 0,51		-		0,28 ± 0,18	a	1,04 ± 0,58	b	1,42 ± 0,01	b	0,16 ± 0,22	
Total (µg/mL)	-		883,9 ± 192,9		1392,2 ± 535,7		1743,7 ± 121,1		2005,8 ± 865,0		839,9 ± 72,5	

Primera columna (valores) muestra la composición de AG de ambos concentrados. EMAG: ésteres metílicos de los ácidos grasos, CMz: concentrado de grasa de mazada, CAK: concentrado de aceite de krill. Letras superíndices diferentes muestran diferencias significativas en un intervalo de confianza de 95%.

En cuanto a la composición de AG de los plasmas de ambos grupos, en general, se mostraron diferencias entre ambos grupos tanto en el porcentaje inicial de AG, así como en los tiempos de biodisponibilidad de cada AG. Este hecho, puede deberse a la diferente composición lipídica de cada dieta, así como la diferente distribución de los AG en las moléculas de TG, DG, MG y LP (Couedelo *et al* 2011). Un ejemplo de la diferente biodisponibilidad plasmática en relación con la composición de la dieta es el efecto observado en la evolución de los AG C14:0 y C16:1 en el plasma de los animales estudiados. El AG C14:0 del plasma de los animales que consumieron la dosis de CAK tuvo su mayor concentración en plasma tras 1h de la ingesta. Sin embargo, el C14:0 del plasma de los animales a los que se les suministró CMz, mostró la mayor concentración a las 4h tras la ingesta (Tabla 4.3., Figura 4.3.). Por otro lado, la evolución del AG 16:1 tuvo su máximo incremento en plasma tras 1h de la ingesta en los animales que consumieron tanto CMz como CAK ($p<0.05$). Además, el incremento fue más pronunciado en los animales que ingirieron CAK, probablemente debido a una mayor cantidad en la composición inicial de los concentrados (Tabla 4.3., Figura 4.3.).

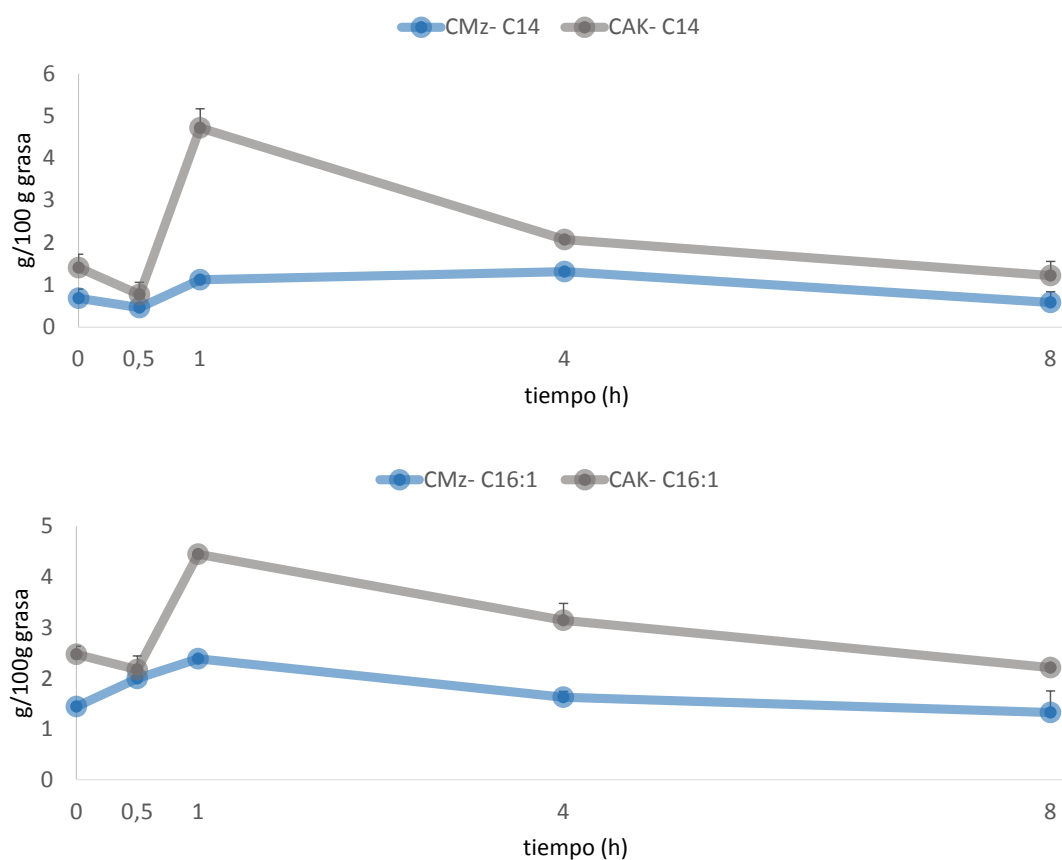


Figura 4.3. Evolución C14:0 y C16:1 en plasma entre los grupos a los que se les administró concentrado de lípidos polares de mazada (CMz) o de krill (CAK). No se muestran las diferencias significativas. No se muestran las diferencias significativas (en Tabla 4.3.).

Castro-Gómez *et al* (2015), en el fraccionamiento y análisis de AK que realizaron en función de la polaridad de las clases lipídicas (TG/ DG, AGL, Col, MG/ y LP), mostró que el AG C14:0 se encontraba principalmente formando parte de los TG. Por otro lado, la composición del CMz del presente estudio, muestra mayoritariamente LP en su composición (86%), lo que implica que el contenido de C14:0, se encuentra en la estructura de los LP del producto. En este contexto, cabe mencionar que la digestión de LP de la dieta no comienza hasta llegar al intestino delgado, sin embargo, los TG comienzan a ser hidrolizados ya desde la primera parte del tracto digestivo por la lipasa lingual y gástrica (Cohn *et al.*, 2010), por lo que la absorción de los LP podría ser más lenta respecto a otras clases lipídicas como los TG. Así, la mayor concentración de C14 a las 4h tras la ingesta del CMz, estaría relacionada con una absorción más tardía de los LP del concentrado.

En la misma línea, la composición en AG C18:1 n-9 (AO) del plasma de los animales a los que se les administró CMz y CAK, cuyo contenido en los productos es de un 34% y 8.3% respectivamente (Tabla 4.3.), se muestra en la Figura 4.4. Aunque no se observaron diferencias significativas en el contenido de AO en plasma de los animales que consumieron CAK, sí se observa una tendencia en la que la máxima absorción se obtuvo tras 1h de la ingesta y a las 8h de haber ingerido el CAK se observan niveles basales de AO en plasma. Por otro lado, la composición en AO de los animales que consumieron CMz, a partir de 1h tras la ingesta se incrementa el contenido en AO en plasma ($p<0.05$) y estos niveles se mantienen durante las 8h del estudio. Este diferente comportamiento, de nuevo, podría estar directamente relacionado con la composición en clases lipídicas de cada producto y la distribución de AG. Así, el AO del CAK se encuentra principalmente en la estructura de TG y DG (Castro-Gómez *et al.*, 2015) y, por el contrario, en el CMz, este AG está unido principalmente a LP (Tabla 4.3.).

Por otro lado, cabe mencionar la composición en ácido linoleico conjugado (CLA) en productos lácteos. El CLA pertenece a un conjunto de isómeros del AL, sintetizado fundamentalmente por las bacterias del rumen en el proceso de hidrogenación de ácidos grasos poliinsaturados por lo que se trata de AG característicos de carne y derivados lácteos (Calvo *et al.*, 2014). De este modo, en el plasma de los animales que consumieron CMz, no se apreciaron niveles plasmáticos de CLA a tiempo 0, pero se observó un incremento a partir de 30min, que se mantuvo hasta las 4h y finalmente disminuyó a tiempo final del estudio (8h) (Figura 4.5.). Rodríguez-Alcalá *et al.*, (2015), realizaron el estudio farmacocinético en ratas Wistar de ácido ruménico (isómero principal del CLA), donde también observaron su incremento plasmático tras 30min de

la ingesta. Además, se mostraba la mayor concentración plasmática de ácido ruménico tras 2h-4h de su consumo, acorde con los resultados del presente estudio.

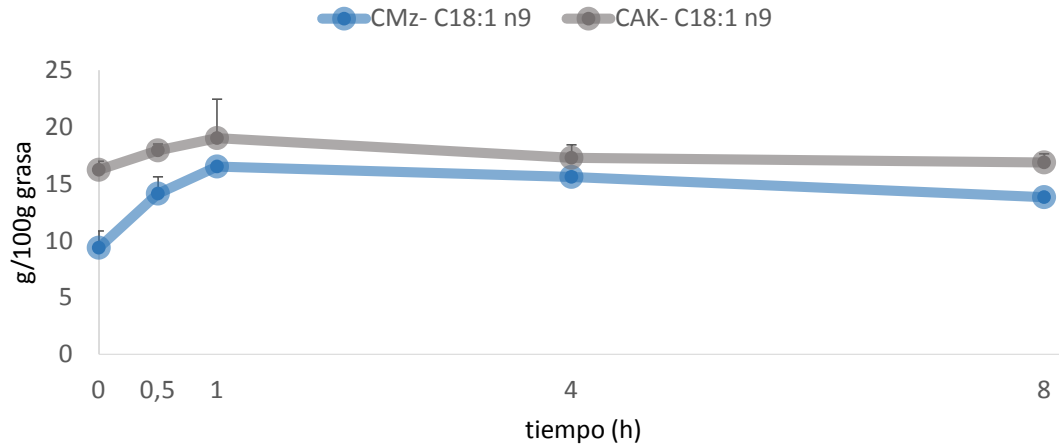


Figura 4.4. Evolución de C18:1 n-9 (AO) en plasma entre los grupos a los que se les administró concentrado de lípidos polares de mazada (CMz) o de krill (CAK). No se muestran las diferencias significativas (ver Tabla 4.3.).

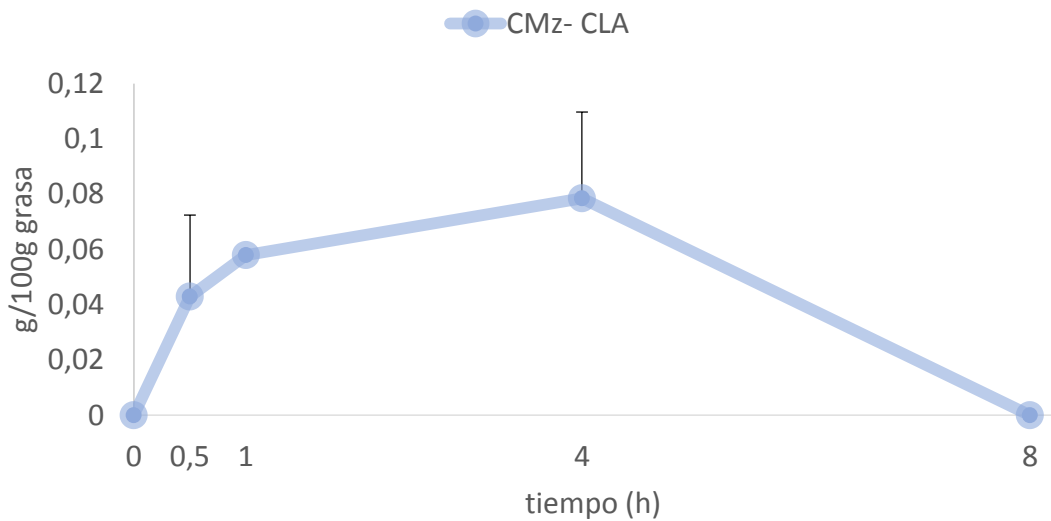


Figura 4.5. Evolución de CLA en plasma del grupo que consumió CMz. No se muestran las diferencias significativas (en Tabla 4.3.).

La composición obtenida en EPA y DHA del plasma de los animales que consumieron la dosis de CAK, se muestra en la Figura 4.6. En ambos AG, el máximo porcentaje en la composición plasmática del grupo administrado con CAK fue entre 1h y 4h tras la ingesta, hecho que podría estar directamente relacionado con el contenido de EPA y DHA en las diferentes clases lipídicas del AK en las que se encuentra incorporado, encontrándose principalmente en DG y sobre todo, FC (Burri *et al.*, 2013; Castro-Gómez *et al.*, 2015), que presenta mayores tiempos de absorción respecto a los DG. Por otro lado, los valores de EPA en el grupo suplementado con CMz, mostraron un porcentaje significativamente más alto tras 1h respecto a la composición plasmática a tiempo 0h. Si bien, el CMz no contiene EPA en su composición, presenta un contenido de AAL de un 0.6% (Tabla 4.3.). Este incremento plasmático de EPA, podría estar relacionado con la bioconversión hepática del AAL procedente de la dieta. Morales *et al.*, 2012 describieron la bioconversión del AAL como una de las posibles rutas de este AG en el organismo, además de las rutas de oxidación hepática, o acumulación en el tejido adiposo. Además, los mismos autores confirman una mayor efectividad de síntesis del AG EPA respecto a la síntesis de DHA en la bioconversión hepática del AAL.

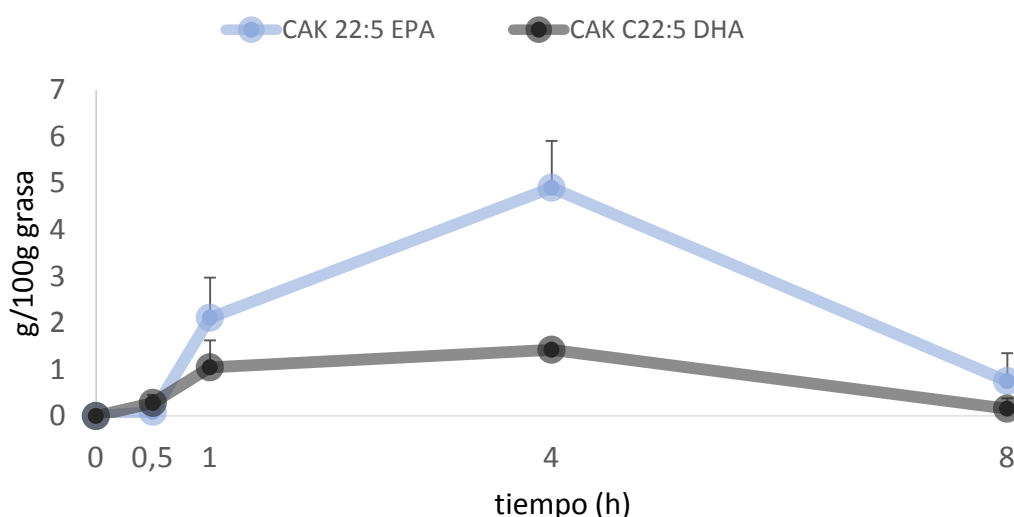


Figura 4.6. Evolución de EPA y DHA en plasma del grupo que consumió CAK. No se muestran las diferencias significativas (en Tabla 4.3.).

4. CONCLUSIONES PARCIALES

En el presente estudio ha sido descrita la biodisponibilidad de los productos enriquecidos en LP de Mz y AK por medio de la evaluación de la composición en lípidos plasmáticos tras la ingesta. Así, se han mostrado tiempos de máxima absorción en plasma a partir de 30 minutos tras la ingesta, que variaron en función del compuesto lipídico del producto, siendo menores los tiempos de absorción de glicéridos y, por tanto, los AG presentes en su estructura, respecto a los tiempos de absorción de los LP de la dieta. Por otro lado, los mayores tiempos de absorción por parte de los LP, podrían resultar en mayores tiempos de disponibilidad de los AG que forman parte de su estructura, para ser absorbidos por las células de los diferentes tejidos diana.

5. ANÁLISIS LIPIDÓMICO DE TEJIDOS DE RATAS DE EDAD AVANZADA SUPLEMENTADAS CON UN COMPLEMENTO NUTRICIONAL RICO EN LÍPIDOS POLARES DE MAZADA Y KRILL

CAPÍTULO V:

ANÁLISIS LIPIDÓMICO DE TEJIDOS DE RATAS DE EDAD AVANZADA SUPLEMENTADAS CON UN COMPLEMENTO NUTRICIONAL RICO EN LÍPIDOS POLARES DE MAZADA Y ACEITE DE KRILL

1. INTRODUCCIÓN

Como se ha señalado anteriormente, los lípidos juegan un papel crucial en la señalización celular, así como en la fisiología de tejidos. El metabolismo lipídico parece ser de una gran importancia en el sistema nervioso como segundo órgano en cantidad de lípidos que contiene tras el tejido adiposo (Adibhatla *et al.*, 2006). Por ello, alteraciones en la regulación de la composición lipídica del tejido cerebral se han relacionado con desórdenes neurológicos como esquizofrenia, enfermedad de Alzheimer (EA), Parkinson, o Niemann-Pick (Wenk, 2005). En concreto, compuestos lipídicos como los LP y los AGPI n-3 están estrechamente relacionados con las funciones neurológicas. En este contexto, ya ha sido descrito el papel de algunos LP como la EM o la FS y su relación con el sistema neuronal (Burling *et al.*, 2008; Conway *et al.*, 2014; Castro-Gómez *et al.*, 2015). Otro ejemplo es la elevada cantidad de DHA que se encuentra en tejidos cerebrales, aportando propiedades de fluidez y permeabilidad a las membranas y actuando sobre las funciones de las proteínas integradas en éstas. Así, se ha visto una relación entre pacientes con EA y bajos contenidos en DHA en cerebro, además de una relación positiva con el consumo de este AG y el menor riesgo de padecer enfermedades de deterioro cognitivo (Astarita y Piomelli, 2010). En este contexto, la suplementación nutricional con LP (lácteos y marinos) y su relación con la funcionalidad neuronal, hace imprescindible el estudio lipidómico de los tejidos implicados para alcanzar un mayor conocimiento de los posibles mecanismos relacionados con la mejora o deterioro del sistema neuronal. Abordar el estudio de la caracterización de los lípidos en los distintos tejidos biológicos en profundidad, implica el uso y conocimiento de numerosas técnicas, tanto de aislamiento y purificación, de cromatografía (HPLC, GC), de espectrometría de masas (ESI-Tandem MS, MALDI-TOF/MS, QToF-MS), o de resonancia magnética nuclear

(NMR) (Adibhatla *et al*, 2006). Por ello, en este capítulo se emplearán algunas de estas técnicas para abarcar una parte del conocimiento lipidómico con la caracterización de la composición lipídica de tejidos implicados en el metabolismo de lípidos y su relación con la suplementación de dietas enriquecidas en LP de origen lácteo y marino.

2. OBJETIVOS

En base a los antecedentes descritos, el objetivo de este capítulo ha sido evaluar el efecto de la incorporación de un complemento enriquecido en LP de diferentes fuentes (mazada y/o aceite de krill) a la ingesta de ratas de edad avanzada, en la composición del perfil lipídico de tejidos implicados tanto en el metabolismo lipídico como con la actividad cognitiva.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Elaboración de los complementos nutricionales ricos en lípidos polares para su incorporación a la dieta diaria de ratas

Los complementos nutricionales se elaboraron a partir de los concentrados de LP obtenidos y caracterizados en el apartado anterior (capítulo III).

➤ Preparación de las dosis de los concentrados ricos en lípidos polares

La dosis de los complementos de lípidos polares de Mz se calculó de acuerdo a las recomendaciones nutricionales establecidas para un individuo adulto. La ingesta diaria recomendada (CDR, cantidad diaria recomendada) de fosfatidilserina (FS) es de 300-500 mg/ día (FAO/WHO, 2010), mientras que para EPA y DHA, la CDR de consumo está establecida en 500 mg EPA+DHA/ día (FAO/WHO, 2010). Para la extrapolación de esta dosis a ratas Wistar de aproximadamente 500 g, se calculó la cantidad necesaria de cada concentrado mediante la “Fórmula para la conversión de dosis basada en BSA” según describe (Reagan-Shaw *et al*, 2008):

Fórmula para la conversión de dosis basada en BSA

$$\text{HED (mg/Kg)} = \text{dosis animal (mg/Kg)} \times \frac{K_m \text{ Animal}}{K_m \text{ Humano}}$$

HED: dosis equivalente en humanos

$K_m = \text{peso (Kg)} / \text{BSA (m}^2\text{)}$

$\text{BSA (área superficial del cuerpo)} = \text{peso (Kg)}^{0,425} \times \text{altura (cm)}^{0,725} \times 0,007184$

En base a ello, para un peso de 0.5 Kg, sería necesario suministrar 9 mg de FS en la dieta diaria de cada rata, lo que supuso emplear una cantidad de 70mg del concentrado de lípidos polares de mazada (CMz)/rata/día. Es importante reseñar que en esta concentración de CMz, se encuentran igualmente presentes cantidades importantes de otros FL y SL (Figura 5.1).

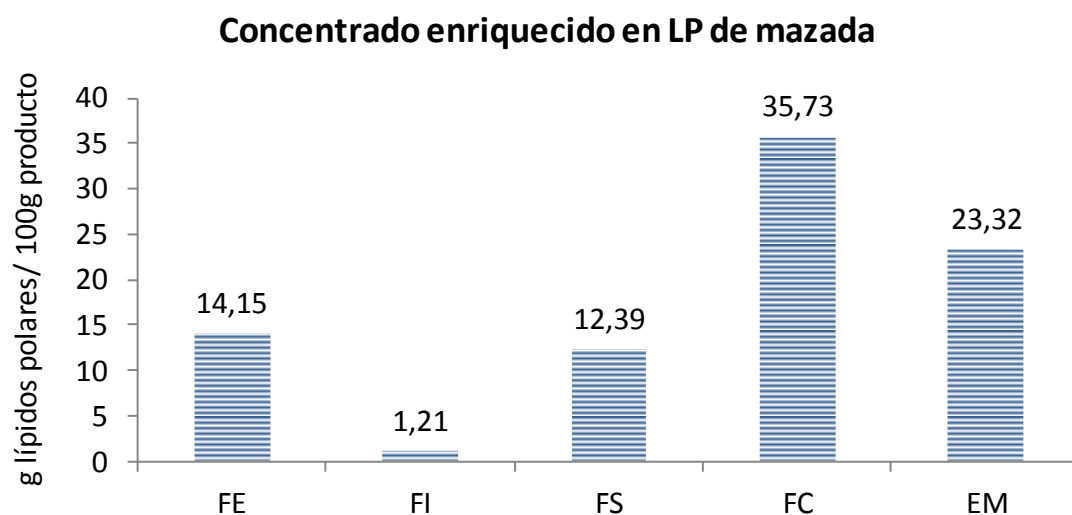


Figura 5.1. Composición en lípidos polares del concentrado enriquecido de mazada. FE: fosfatidiletanolamina, FI: fosfatidilcolina, FS: fosfatidilserina, FC: fosfatidilcolina, EM: esfingomielina, LP: lípidos polares.

En cuanto a la dosis diaria de EPA+DHA, aplicando la misma fórmula y calculando un peso de animal de 0.5 kg, era necesario suministrar 15mg de EPA+DHA, lo que suponía emplear 70 mg de concentrado rico en lípidos polares obtenidos de aceite de krill (CAK)/rata/día. Igualmente, indicar que en la composición de CAK, los ácidos grasos EPA y DHA se encuentran mayoritariamente formando parte de FC y de DG (Figura 5.2.).

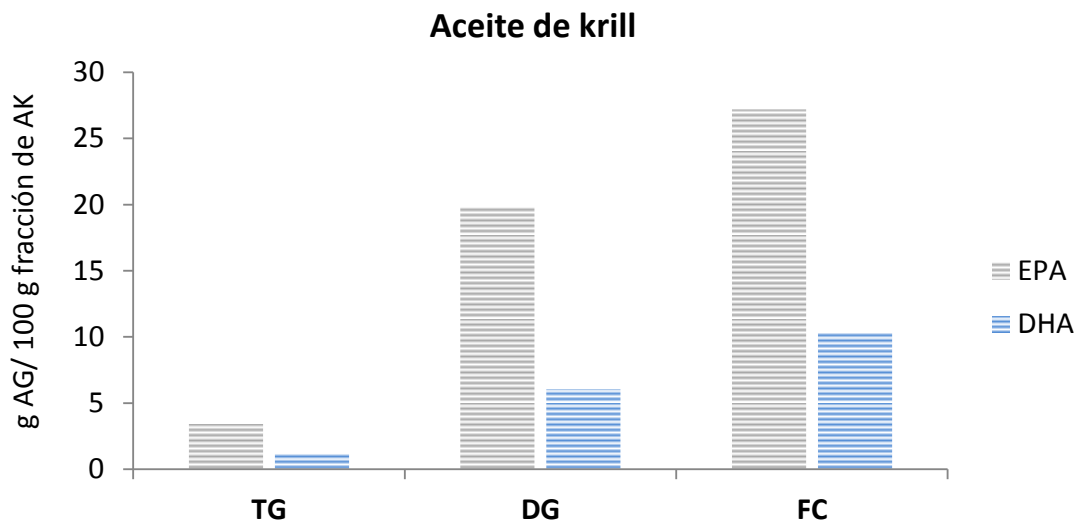


Figura 5.2. Composición en EPA y DHA en las fracciones: triglicéridos (TG), diglicéridos (DG), y fosfatidilcolina (FC) del aceite de krill (g de ácido graso/ 100 g de fracción de AK) (Castro-Gómez *et al.*, 2015).

Para la incorporación de los complementos en la dieta de los animales se prepararon monodosis de concentrados de LP en gelatinas para su consumo diario. Para la preparación de las monodosis se ensayaron diferentes tipos y marcas de gelatinas para incorporar el concentrado de LP. Finalmente, se decidió emplear una gelatina que permitía su homogenización y congelación para su consumo posterior sin perder la consistencia final. Estas gelatinas (marca comercial Royal, sabor fresa) fueron preparadas según las indicaciones del fabricante y ensayadas con los animales en formato de 1 mL en estado congelado (en tubo eppendorf), e incorporando un palillo para facilitar su manejo, y mostraron ser de gran aceptación (Figura 5.3).

Se prepararon las monodosis para 4 grupos de ratas incorporando la dosis final de LP: CMz, CAK, mezcla de CMz+CAK (para incorporar la CDR de EPA+DHA y FS de manera conjunta) y aceite de oliva como control (70mg/mL). Para ello, los concentrados lipídicos se homogeneizaron con la gelatina mediante un agitador magnético (Boeco Germany, Hamburgo, Alemania) para obtener la dosis final de 9 mg de FS y/o 15 mg de EPA+DHA descrita anteriormente. Una vez dosificadas las monodosis de 1 mL, se congelaron a -35°C y se mantuvieron a esta temperatura hasta su administración de 1 unidad al día para cada uno de los animales.

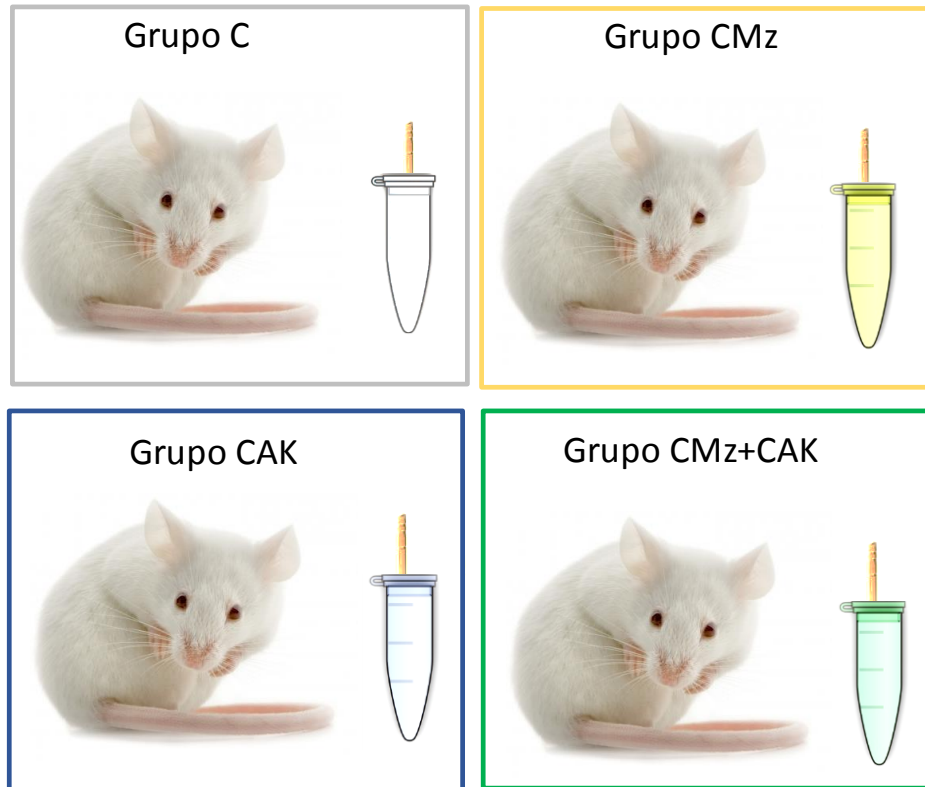


Figura 5.3. Representación esquemática de la suplementación diaria de los animales. Codificación de los eppendorfs: Blanco (Grupo control -C-), amarillo (Grupo enriquecido en LP de mazada -CMz-), azul (Grupo enriquecido en LP de krill -CAK-), verde (grupo enriquecido en LP de Mz y AK -CMz+CAK-).

3.2. Animales y diseño experimental

3.2.1. Diseño experimental

Para llevar a cabo el estudio de intervención dietética se emplearon un total de 55 ratas adultas macho Wistar de 18 meses de edad con un peso aproximado entre 500-600 g, distribuidas en grupos de 2 ratas por jaula, con ciclos de 12:12 horas luz: oscuridad (de 8 am a 8 pm) y condiciones de temperatura y humedad constante ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ y 50 % H.R.). El cuidado de las ratas se llevó a cabo según las normas propuestas por la Comunidad Europea (86/609/EEC).

Los animales fueron alimentados con pienso EURodent Diet 22% (LabDiet), previamente seleccionado entre varios piensos por presentar una composición lipídica apropiada (por su bajo contenido en FL y EPA+DHA) y agua *ad libitum*. Posteriormente, se dividieron aleatoriamente en 4 grupos y se suplementaron las dietas con la monodosis diaria que contenía el complemento de LP correspondiente a cada grupo. En la Figura 5.4. se detalla diseño experimental.

3.2.2. Estudios de comportamiento y posterior sacrificio para obtención de los tejidos de los animales

Después de 3 meses de suplementación diaria, los animales fueron dispuestos para llevar a cabo los estudios de comportamiento y determinación de su actividad cognitiva. Posteriormente a estos ensayos, se mantuvo a los animales en las mismas condiciones previas y con la misma dieta suplementada durante 2 semanas más para permitir su estabilización y evitar en lo posible que el estrés causado pudiera interferir en los estudios de metabolismo. A continuación, durante la misma mañana se llevó a cabo el sacrificio de los animales mediante decapitación con guillotina tras ayuno nocturno. Se diseccionaron y obtuvieron las distintas áreas cerebrales: corteza frontal (CF), temporal (CT), occipital (CO), hipocampo (HP) y cerebelo (CB). Asimismo, se extrajeron los tejidos adiposos subcutáneo (TAS) y visceral (TAV) y el hígado (H). La sangre se recogió en tubos con heparina (100 IU/mL) y posteriormente se centrifugó durante 15 min a 2000 rpm para separar el plasma (Plasma) de los elementos formes, como eritrocitos (Erit). Todas las muestras fueron congeladas inmediatamente tras la extracción y se conservaron a -80°C hasta su análisis (Figura 5.4.).

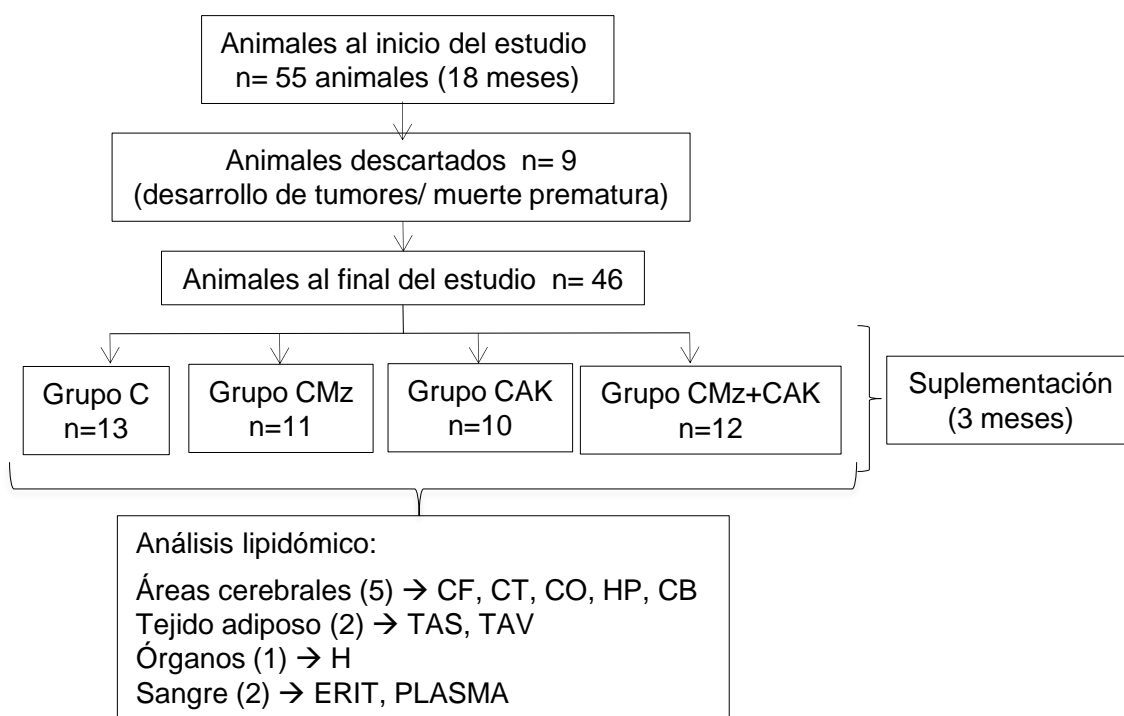


Figura 5.4. Diseño experimental de los animales suplementados con concentrados ricos en lípidos polares procedentes de mazada y/o aceite de krill. C: control, CMz: concentrado de lípidos polares de mazada, CAK: concentrado de lípidos polares de krill, CF-T-O: corteza frontal, temporal y occipital. HP: hipocampo, CB: cerebelo, TAS-V: tejido adiposo superficial y visceral, Erit: eritrocitos.

3.3. Extracción de la fracción lipídica de los tejidos animales estudiados

Los procesos de extracción de la fracción lipídica de los distintos tejidos animales han sido descritos con detalle en el apartado “3.3.” del CAPÍTULO IV. Los volúmenes de los disolventes empleados para la extracción se ajustaron al peso y a la cantidad de grasa esperada de los diferentes tejidos. La proporción de los disolventes se mantuvo constante en todos los casos tal y como figura en la tabla 5.1.

Tabla 5.1. Proporción de disolventes empleados en la extracción para cada tejido animal estudiado.

	metanol (mL)	diclorometano (mL)	ácido acético (mL)
Plasma	13,28	15,94	8,00
Eritrocitos	13,28	15,94	8,00
Tejido adiposo	13,28	15,94	8,00
Cerebro	3,32	9,96	2,00
Hígado	3,32	9,96	2,00

3.4. Composición de las clases lipídicas presentes en cada una de las muestras, analizadas mediante HPLC-ELSD

La metodología empleada ha sido descrita con detalle en el apartado “3.5.” del CAPÍTULO III.

3.5. Determinación de esfingolípidos de cerebro mediante UPLC-QToF-MS

La identificación de esfingolípidos de tejido cerebral, previamente cuantificados por HPLC-ELSD, se llevó a cabo mediante la técnica de alta resolución UPLC-QToF-MS en el Centro para el Desarrollo de la Biotecnología (CBD), CSIC, Valladolid, con la colaboración del Dr. Olimpio Montero Dominguez, experto en Cromatografía líquida y Espectrometría de masas aplicadas a Metabolómica y Biotecnología.

La muestra de grasa previamente extraída de cerebelo de rata (como muestra ejemplo de la caracterización lipídica de las fracciones no identificadas de las partes cerebrales estudiadas) se disolvió en 746 μL de $\text{H}_2\text{CCl}_2\text{:CH}_3\text{OH}$ (2:1), se sonicó y se hizo una segunda extracción con 300 μL de H_2CCl_2 tras añadir agua Milli-Q (178 μL) para separar las fases. Se recogieron las fases acuosa y orgánica, añadiendo 600 μL de CH_3OH a la fase acuosa tras la separación, y se evaporaron por separado,

resuspendiendo el residuo sólido (pellet) de cada una de ellas en una mezcla de CH₃OH:H₂O (1:1, v/v), en 0.5 mL para la fase orgánica y en 0.3 mL para la fase acuosa. No se observó la presencia de un resto sólido tras resuspender. Dado que los gangliósidos, y otros cerebrósidos, tienen una parte hidrofóbica, constituida por la ceramida, y una parte hidrófila, constituida por la cadena de azúcares y compuestos relacionados, se consideró conveniente medir las dos fracciones. Así pues, ambas muestras se midieron con el mismo método cromatográfico y de espectrometría de masas. Para el método cromatográfico UPLC, se usó un gradiente binario constituido por el disolvente A, H₂O: CH₃OH (8:2, v/v), y el disolvente B, 100% acetonitrilo (ACN), ambos con 0.1% de ácido fórmico, y un flujo de 0.35 mL/min. Se inyectaron 7.5 µL. El gradiente estuvo formado por las siguientes etapas: Inicial, 99.9% A; 1.0 min, 99.9% A; 3.5 min, 20% A; 5.0 min, 20% A; 9.5 min, 0.1% A; 14.0 min, 99.9% A; 15 min, 99.9% A. La separación de compuestos se llevó a cabo en una columna BEH HSS T3 (Waters, Massachusetts, EEUU), 2.1 × 100 mm, y 1.7 µm de tamaño de partícula, la cual se mantuvo a 35 ° C durante todo el análisis. Para el procedimiento de espectrometría de masas se usó un método MSE, con una función de baja energía (full-scan, función 1) y una función de alta energía que permite la fragmentación del pico base de manera continua (función 2). Los parámetros fijados fueron: tiempo de escaneado, 0.2 s; voltaje de cono, 25V; energía de colisión de trampa, 40-50V; capilar, 2.5V; cono de muestreo, 24; cono de extracción, 5.0; temperatura de fuente, 100 °C; temperatura de desolvatación, 320°C; gas de cono, 35 L/h; gas de desolvatación, 950 L/h. Como referencia se usó leucina-encefalina, y como calibrante se usó formiato sódico. La detección se hizo con ionización en positivo en el rango m/z 100-1200 Da, obteniendo los iones que se indican más abajo. La adquisición de datos se llevó a cabo con el software MassLynx®. Para la cuantificación se determinó la relación área de pico cromatográfico (a partir del cromatograma extraído del ión de interés) versus diversas concentraciones dadas y conocidas previamente de un estándar comercial. El estándar deuterado que se utilizó fue Palmitoyl (CH₃-d₃)-Lactosyl-ceramide (LacCer(d18:1/16:0-d₃, referencia 71-1071), de Larodan AB (Solna, Sweden), con composición elemental C₄₆H₈₇NO₁₃-d₃ y masa exacta de 864.6412.

3.5. Composición en ácidos grasos por CG-MS

La metodología empleada ha sido descrita con detalle en el apartado “3.6.” del CAPÍTULO III.

3.6. Estudio estadístico

El estudio estadístico se realizó mediante un análisis de varianza (ANOVA) con pruebas no paramétricas con el empleo de Bonferroni como estudio post-hoc. El programa utilizado para ello fue el paquete SPSS (SPSS 22.0 for Windows, SPSS inc. IBM, Armark, Nueva York, EEUU). El nivel de significancia se fijó en 95%.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Selección del pienso para alimentación basal de las ratas empleadas en el estudio de intervención nutricional

Para la elección de la dieta basal de los animales se analizó la composición de 5 tipos de pienso: C: SAFE V8405610R , D: SAFE V8224610R -D-, AO3: SAFE AO3, AO4: SAFE AO4, suministrados por SAFE Diets (Augy, Francia), y LABDIET: pienso EURodent 22%, suministrado por LabDiet (San Luis, Misuri). Los resultados en contenido graso y el perfil en AG y CL se muestran en la Tabla 5.2.

Como se puede observar en la Tabla 5.2., el contenido en grasa de los piensos, varió entre un 1.4 y 4.4 % (g grasa/100g pienso), siendo el pienso D, el que menor contenido en lípidos tuvo y AO3 el que mayor contenido presentó. En cuanto a la composición en CL, los TG fueron la clase mayoritaria en todos los piensos analizados (76%-83%), seguidos de los DG con un contenido entre 6-14%. El contenido en LP varió entre 1.3-6% LP (pienso C y D, respectivamente), siendo la FC el FL mayoritario en todos los piensos analizados. Por otro lado, en cuanto a la composición en AG, el pienso C mostró un perfil de AG muy diferente al resto de piensos analizados, lo que seguramente es debido a una grasa de distinto origen. Así, el pienso C presentó un contenido en AO del 41% (g AG/100g grasa), respecto al resto de piensos analizados, que presentaron contenidos entre 19-21% de AO. Además, en este pienso no se detectaron AGPICL n-3, mientras que en los piensos D, AO3, AO4 y LabDiet, sí se cuantificaron en diferentes proporciones (Tabla 5.2.).

Para llevar a cabo la selección del pienso de la dieta de los animales, se tuvo en cuenta en su composición que el contenido graso no fuera elevado y que además contuviera una cantidad mínima de AGPICL n-3 (EPA y DHA) y de LP, suficiente para proporcionar un perfil nutricional completo en todos los grupos, que no interfiriera con el complemento enriquecido en LP de Mz y AK que se iba a suministrar diariamente a los animales del estudio. De este modo, el pienso LabDiet fue seleccionado como

CAPÍTULO V

dieta basal de los animales durante el desarrollo del estudio al presentar contenidos intermedios de grasa (2.3 %) y LP (3.6 %) respecto a los otros piensos analizados, así como valores relativamente bajos de EPA y DHA en el perfil total de AG (0.15% y 0.12% respectivamente).

Tabla 5.2. Contenido graso y composición lipídica de los piensos C, D, AO, AO4 y LabDiet.

Pensos para dieta basal de los animales										
% graso	C		D		AO3		AO4		LAB DIET	
	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE
	3,36 ± 0,14		1,41 ± 0,16		4,35 ± 0,61		3,34 ± 0,54		2,26 ± 0,14	
g clase lipídica/ 100 g grasa (HPLC-ELSD)										
CE	1,55 ± 0,03		1,40 ± 0,03		0,89 ± 0,02		1,48 ± 0,04		0,70 ± 0,03	
TG	78,28 ± 0,99		80,79 ± 1,23		75,79 ± 1,30		77,09 ± 0,41		83,41 ± 1,78	
DG	13,95 ± 0,62		5,91 ± 0,23		14,21 ± 1,18		7,42 ± 0,04		7,99 ± 1,04	
AGL+Col	2,87 ± 0,24		2,82 ± 0,21		3,34 ± 0,19		3,89 ± 0,08		2,51 ± 0,27	
MG	1,18 ± 0,06		1,90 ± 0,13		2,08 ± 0,08		2,15 ± 0,10		1,20 ± 0,10	
GLUCER	0,31 ± 0,02		0,61 ± 0,07		0,20 ± 0,02		0,60 ± 0,02		0,21 ± 0,04	
n.i.	0,49 ± 0,02		1,23 ± 0,16		0,29 ± 0,02		1,41 ± 0,13		0,43 ± 0,07	
ΣLP	1,35 ± 0,06		5,34 ± 0,57		3,19 ± 0,09		5,95 ± 0,28		3,56 ± 0,25	
FE	5,81 ± 0,21		5,78 ± 0,66		5,15 ± 0,23		5,59 ± 0,15		11,44 ± 0,32	
FI	6,55 ± 1,08		9,09 ± 0,76		9,65 ± 0,21		7,37 ± 0,15		14,04 ± 0,95	
FC	87,64 ± 0,99		85,13 ± 1,22		85,20 ± 0,43		87,04 ± 0,02		74,52 ± 1,21	
g AG/ 100 g grasa (GC-MS)										
C12	-		0,05 ± 0,01		0,07 ± -		0,07 ± 0,01		0,02 ± 0,00	
C14	0,07 ± 0,01		0,34 ± 0,03		0,49 ± -		0,61 ± 0,04		0,39 ± 0,01	
C14:1	0,02 ± 0,01		0,05 ± 0,01		0,07 ± -		0,09 ± 0,01		0,06 ± 0,00	
C16	11,48 ± 0,40		15,60 ± 0,23		14,86 ± 0,15		17,88 ± 0,82		15,89 ± 0,55	
C16:1	0,09 ± 0,02		0,32 ± 0,02		0,49 ± -		0,63 ± 0,03		0,46 ± 0,01	
C17	0,03 ± 0,01		0,06 ± 0,01		0,11 ± -		0,10 ± 0,01		0,13 ± 0,01	
C18	1,85 ± 0,14		1,63 ± 0,04		2,71 ± 0,07		1,87 ± 0,05		3,79 ± 0,01	
C18:1c9	41,12 ± 0,76		18,69 ± 0,12		18,85 ± 0,10		18,40 ± 0,12		21,50 ± 0,07	
C18:1 c11	1,11 ± 0,20		1,01 ± 0,02		1,24 ± 0,04		1,20 ± 0,03		1,16 ± 0,02	
C18:2 n6	40,88 ± 0,07		56,81 ± 0,13		52,71 ± 0,28		51,03 ± 0,17		51,59 ± 0,31	
C20:1	0,19 ± 0,08		0,18 ± 0,03		0,25 ± -		0,24 ± 0,04		0,28 ± 0,03	
C18:3 n3	2,83 ± 0,53		4,49 ± 0,21		6,45 ± 0,08		5,11 ± 0,17		4,04 ± 0,16	
C22	0,32 ± 0,12		0,13 ± 0,02		0,25 ± 0,03		0,20 ± 0,03		0,22 ± 0,03	
C22:1	-		-		0,71 ± 0,06		0,74 ± 0,10		-	
C20:5 n-3	-		0,27 ± 0,03		0,29 ± -		0,67 ± 0,05		0,15 ± 0,02	
C24	-		-		-		-		0,19 ± 0,05	
C22:6 n-3	-		0,36 ± 0,06		0,43 ± 0,04		1,15 ± 0,15		0,12 ± 0,02	

CE: éster de colesterol, TG: triglicéridos, DG: diglicéridos, AGL+Col; ácidos grasos libres y colesterol, MG: monoglicéridos, Glucer: glucosilceramidas, LP: lípidos polares, FE: fosfatidiletanolamina, FI: fosfatidilinositol, FC: fosfatidilcolina, n.i.: no identificado, AG: ácido graso

4.2. Composición lipídica de los complementos nutricionales ricos en lípidos polares

La composición en CL y EMAG de los complementos nutricionales incorporados como monodosis a las dietas de los animales, se detalla en las Tablas 5.3a. y 5.3b.

Tabla 5.3a. Composición en clases lipídicas de los complementos nutricionales suplementados a la dieta de los animales.

g CL/ 100g suplemento	Complementos nutricionales							
	C		CMz		CAK		CMz+CAK	
	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE
EC	-		<0,01	-	0,25 ± 0,06		0,14 ± 0,02	
TG	83,51 ± 1,18		5,09 ± 1,68		30,67 ± 2,95		25,62 ± 1,63	
DG	16,44 ± 1,18		1,53 ± 0,17		15,53 ± 0,62		7,30 ± 0,52	
FFA+Col	0,05 ± 0,01		0,59 ± 0,01		1,56 ± 0,64		1,05 ± 0,02	
MG	-		0,09 ± 0,02		0,21 ± 0,03		0,23 ± 0,05	
GluCer	-		1,33 ± 0,08		-		0,91 ± 0,03	
LacCer	-		3,56 ± 0,49		-		1,00 ± 0,10	
ΣLP	-		87,82 ± 1,49		51,78 ± 3,95		63,75 ± 1,73	
ΣLP								
FE	-		15,66 ± 1,19		0,55 ± 0,13		5,16 ± 0,28	
FI	-		1,92 ± 0,17		-		0,77 ± 0,14	
FS	-		16,92 ± 0,67		-		6,79 ± 0,38	
FC	-		38,74 ± 0,28		99,45 ± 0,13		72,48 ± 1,85	
EM	-		26,76 ± 0,83		-		14,79 ± 1,12	

EC: éster de colesterol, TG: triglicéridos, DG: diglicéridos, AGL+Col: ácidos grasos libres y colesterol, MG: monoglicéridos, GluCer: glucosilceramida, LacCer: lactosilglucoceramida, FE: fosfatidiletanolamina, FI: fosfatidilinositol, FS: fosfatidilserina, FC: fosfatidilcolina, EM: esfingomielina, LP: lípidos polares. C: Grupo Control (aceite de oliva), CMz: Grupo concentrado de mazada, CAK: Grupo concentrado de aceite de krill.

La distribución en clases lipídicas del complemento nutricional suplementado al Grupo control (Grupo C), se basó en un aceite de oliva comercial y de acuerdo a los análisis, se componía principalmente de TG (83%) y DG (16%). Estos resultados están de acuerdo con los reportados por Mataix (2001) y Boskou *et al.* (2006), que señalan a los TG como clase lipídica mayoritaria en el aceite de oliva, seguido de DG y otros compuestos minoritarios como AGL, MG, tocoferoles, etc. Los complementos nutricionales que contenían los concentrados de los Grupos CMz, CAK y CMz+CAK, se corresponden a los productos enriquecidos en LP de Mz y AK que se obtuvieron en el escalado de los experimentos descritos en el capítulo III (Tablas 3.5 y 3.9a.). La composición en CL de los concentrados CMz y CAK fueron del 88% y 52% en LP y del 5% y 31% en TG respectivamente. Mientras que, como era de esperar, la composición

del suplemento formado por la mezcla de CMz y CAK (Grupo CMz+CAK), mostró una distribución de CL que se corresponde aproximadamente con la composición media de CMz y CAK, con un contenido de 64% de LP y un 26% de TG como CL mayoritarias (Tabla 5.3a y Figura 5.5.).

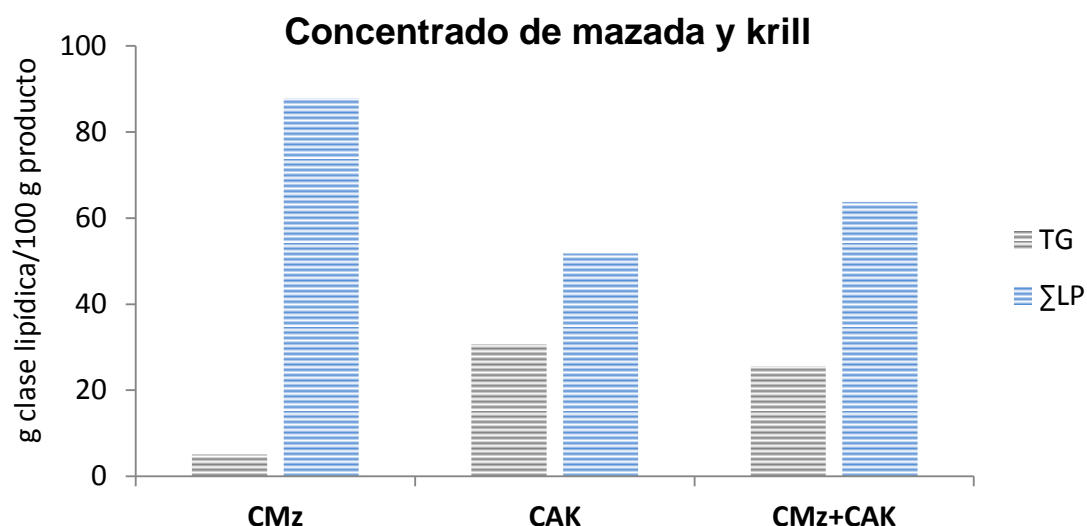


Figura 5.5. Composición en triglicéridos (TG) y lípidos polares (LP) de concentrado en LP de mazada (Mz), concentrado en LP de krill (CAK), y suma de ambos (g clase lipídica/100 g producto).

La distribución en AG del complemento C se compuso principalmente por AO con un 74%, seguido de un 12% de ácido palmítico (C16) y de AL n-6 con un 6%. Otros autores, como Mataix (2001) y Ollivier *et al.* (2006) reportaron una distribución similar en la determinación de AG de aceite de oliva virgen de diferentes regiones de España y Francia respectivamente, con un rango de 60-81% de AO, 10-16% de C16 y de 6-15% de AL. En esta misma línea, Alves *et al.* (2016) describen una composición en aceite de oliva virgen del 75%, 13% y 6% en AO, C16 y AL respectivamente. La composición en EMAG de los Grupos CMz y CAK ya ha sido descrita previamente en el capítulo III. El CMz mostró una distribución en AG donde el AO, C16, C18 y AL y C14 fueron los mayoritarios, mientras, en el caso de CAK, los AG EPA, C16 y DHA, fueron los mayoritarios con un 27%, 20% y 10% respectivamente. Por otro lado, el complemento formado por CMz+CAK mostró una amplia distribución en AG con un perfil compuesto mayoritariamente por C16, AO, EPA, DHA y C14 (Tabla 5.3b.).

CAPÍTULO V

Tabla 5.3b. Composición en ésteres metílicos de los ácidos grasos (EMAG) de los complementos nutricionales de la dieta de los animales.

g EMAG/ 100g suplemento	Complementos nutricionales							
	C		CMz		CAK		CMz+CAK	
	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE
C6	-		0,67 ± 0,10		-		-	
C8	-		0,31 ± 0,06		-		-	
C10	-		0,60 ± 0,14		-		-	
C12	-		0,94 ± 0,12		-		0,42 ± 0,04	
C14	-		6,23 ± 0,29		7,59 ± 0,16		6,56 ± 0,11	
C15ai	-		0,13 ± 0,01		-		-	
C15i	-		0,17 ± 0,02		-		-	
C14:1	-		0,89 ± 0,03		0,30 ± 0,00		0,54 ± 0,03	
C15	-		0,39 ± 0,02		-		0,16 ± 0,02	
C16	11,79 ± 0,06		26,70 ± 0,53		19,51 ± 0,39		20,92 ± 0,31	
C16:1	0,74 ± 0,05		1,62 ± 0,03		4,99 ± 0,02		3,63 ± 0,19	
C16:1t	-		-		1,46 ± 0,03		0,92 ± 0,09	
C17:1	-		-		0,34 ± 0,00		-	
C18	3,25 ± 0,11		11,63 ± 0,03		0,56 ± 0,05		4,84 ± 0,57	
C18:1 9t	-		0,27 ± 0,02		-		-	
C18:1 10t	-		0,32 ± 0,04		-		0,24 ± 0,02	
C18:1 11t	-		0,92 ± 0,02		-		0,32 ± 0,05	
C18:1 12t	-		0,27 ± 0,01		-		-	
C18:1 c9	74,06 ± 0,52		34,16 ± 0,59		8,31 ± 0,14		18,42 ± 1,29	
C18:1 15c	2,74 ± 0,14		0,41 ± 0,01		-		-	
C18:1 11c	-		0,87 ± 0,03		7,72 ± 0,04		4,99 ± 0,38	
C18:1 12c	-		0,46 ± 0,02		-		0,28 ± 0,02	
C18:2 t,t	-		0,27 ± 0,01		-		-	
C18:2 n6	6,26 ± 0,10		8,66 ± 0,38		1,67 ± 0,03		4,70 ± 0,31	
C20	0,25 ± 0,04		-		-		-	
C18:3 n3	0,41 ± 0,06		0,61 ± 0,04		1,14 ± 0,04		1,15 ± 0,05	
C20:1	-		-		0,29 ± 0,03		0,25 ± 0,02	
RA	-		0,65 ± 0,04		-		0,27 ± 0,03	
C18:4 n3	-		-		4,22 ± 0,03		2,74 ± 0,29	
C20:3 n6	-		0,58 ± 0,03		-		0,31 ± 0,03	
C20:4 n6	-		0,89 ± 0,06		0,41 ± 0,04		0,76 ± 0,03	
C20:5 n3	-		-		26,84 ± 0,06		16,34 ± 1,12	
C22:6 n3	-		-		10,44 ± 0,51		6,65 ± 0,37	
ΣAGS	15,29 ± 0,11		47,77 ± 0,61		27,66 ± 0,27		32,90 ± 0,64	
ΣAGMI	77,54 ± 0,55		40,20 ± 0,72		23,08 ± 0,15		34,18 ± 1,32	
ΣAGPI	6,66 ± 0,16		11,39 ± 0,42		44,73 ± 0,62		33,17 ± 0,83	
Σn6	6,26 ± 0,10		10,13 ± 0,37		2,09 ± 0,05		5,77 ± 0,50	
Σn3	0,41 ± 0,06		0,61 ± 0,04		43,06 ± 0,65		24,14 ± 1,07	
ΣAGm (<0,2)	0,50 ± 0,10		1,54 ± 0,09		2,22 ± 0,22		2,68 ± 0,07	

AGm; ácidos grasos minoritarios. C: Grupo Control, CMz: Grupo concentrado de mazada, CAK: Grupo concentrado de aceite de krill.

4.3. Composición nutricional de la dieta basal y complemento nutricional suplementado diariamente a los animales

La composición nutricional de cada dieta (alimentación basal + complemento) se detalla en la Tabla 5.4.

Tabla 5.4. Composición nutricional de la dieta completa de los distintos grupos teniendo en cuenta una ingesta de pienso de aproximadamente 50g/día y el complemento enriquecido en LP (monodosis) suplementado diariamente.

aporte dosis/animal/día	Dieta completa			
	C	CMz	CAK	CMz+CAK
energía (Kcal)	201,08	201,11	201,07	201,75
lípidos (g)	1,82	1,82	1,82	1,89
hidratos de carbono (g)	32,10	32,11	32,10	32,11
fibra (g)	2,05	2,05	2,05	2,05
proteínas (g)	11,01	11,01	11,01	11,01

Como se puede observar, la suplementación de la dieta basal de los animales con el complemento nutricional rico en LP (monodosis) no supuso variaciones significativas en el total de energía, lípidos, hidratos de carbono, fibra y proteínas del aporte diario. Esto es debido a que los complementos nutricionales suplementados no suponen más de un 2% de la dieta total diaria de los animales (1g monodosis/día) de los 50g de pienso que consumen aproximadamente cada día. Si bien, hubo ligeras diferencias en la composición nutricional de la dieta complementada con CMz+CAK respecto a C, CMz y CAK (Tabla 5.3.), al contener el doble de producto enriquecido en LP en la monodosis (CMz+CAK).

4.4. Efecto de la dieta suplementada en la ganancia de peso de los animales

Los animales fueron pesados semanalmente durante las 12 semanas de tratamiento. La ganancia de peso no mostró diferencias significativas entre los 4 grupos de dietas experimentales ($p>0.05$) (Tabla 5.5.).

Tabla 5.5. Evolución del peso corporal durante las 12 semanas de suplementación de los animales (g peso x100/ g peso al inicio).

Semana	Grupo C		Grupo CMz		Grupo CAK		Grupo CMz+CAK	
	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE
0	100,00	-	100,00	-	100,00	-	100,00	-
1	100,43 ±	1,54	99,14 ±	1,72	99,76 ±	2,08	98,20 ±	2,99
2	99,73 ±	1,36	98,73 ±	2,45	98,75 ±	3,06	97,11 ±	4,35
3	100,64 ±	1,78	99,74 ±	3,19	99,07 ±	3,14	97,27 ±	4,39
4	100,55 ±	1,33	98,66 ±	3,47	99,34 ±	3,36	97,97 ±	4,78
5	101,22 ±	2,02	99,30 ±	3,81	100,34 ±	3,31	98,50 ±	5,67
6	101,72 ±	1,96	99,64 ±	4,52	100,63 ±	3,37	99,19 ±	4,33
7	102,06 ±	1,67	100,52 ±	5,34	100,76 ±	3,65	99,41 ±	5,35
8	102,10 ±	1,71	101,06 ±	5,05	101,34 ±	3,57	99,48 ±	6,31
9	102,05 ±	2,23	101,05 ±	5,34	101,03 ±	3,77	99,10 ±	6,94
10	101,80 ±	2,54	101,26 ±	5,10	101,86 ±	3,59	100,08 ±	6,15
11	102,57 ±	3,49	101,92 ±	5,62	103,07 ±	3,43	101,24 ±	5,79
12	102,76 ±	3,16	102,03 ±	6,34	103,36 ±	4,50	100,52 ±	8,09

Estos resultados están de acuerdo con lo descrito anteriormente en las tablas de aporte nutricional, donde se puso de manifiesto que el aporte calórico por parte de los complementos respecto al aporte de la dieta habitual de los animales era prácticamente nulo debido al bajo incremento calórico de los complementos. Por otro lado, se ha reportado que el incremento de peso en ratas Wistar macho, se produce hasta, aproximadamente, los 4-5 meses de edad (Cossio-Bolaños *et al.*, 2013), por lo que en las ratas del presente estudio, de 18 meses de edad, no se esperaban variaciones significativas en el peso corporal de los animales.

4.5. Extracción de la fracción lipídica de los tejidos animales

El contenido graso obtenido en los distintos tejidos aislados de los animales estudiados se muestra en la Tabla 5.6.

El contenido graso de los tejidos no mostró diferencias significativas entre los distintos grupos suplementados. El contenido en grasa del H varió en el rango de 3.9-4.4% (p/p), lo que está de acuerdo con los valores reportados por otros autores con un rango del 4-6% (p/p) en ratas Wistar macho (Rajasekaran *et al.*, 2006; Nardelli *et al.*, (2011), así como en otras especies ~5% (p/p) para Sprague-Dawley. (Cha *et al.*, 2001).

Tabla 5.6. Contenido graso (g graso/100g muestra)

g graso/100g muestra	Grupos suplementados							
	C		CMz		CAK		CMz+CAK	
	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE
H	4,26 ±	0,61	3,89 ±	0,84	4,42 ±	1,13	4,31 ±	1,15
TAS	55,80 ±	24,41	57,84 ±	23,87	62,78 ±	20,55	60,15 ±	27,78
TAV	76,06 ±	22,57	83,86 ±	8,66	67,16 ±	31,54	64,11 ±	33,91
CF	7,98 ±	0,68	7,08 ±	0,91	8,55 ±	2,25	8,36 ±	1,35
CT	8,44 ±	0,93	7,33 ±	0,83	8,37 ±	0,56	6,83 ±	2,97
CO	7,61 ±	2,71	8,19 ±	0,73	7,33 ±	3,02	8,27 ±	2,82
HP	6,57 ±	1,83	6,61 ±	2,45	6,64 ±	0,63	7,73 ±	1,06
CB	8,34 ±	3,09	7,93 ±	0,70	8,17 ±	1,27	5,39 ±	3,82
Erit	0,66 ±	0,28	0,69 ±	0,09	0,60 ±	0,17	0,64 ±	0,11
Plasma	0,50 ±	0,15	0,49 ±	0,08	0,67 ±	0,34	0,83 ±	0,56

H: hígado, TAS: tejido adiposo superficial, TAV: tejido adiposo visceral, CF: corteza frontal, CT: corteza temporal, CO: corteza occipital, HP: hipocampo, CB: cerebelo, Erit: eritrocitos, C: dieta control, CMZ: dieta enriquecida en lípidos polares de mazada, CAK: dieta enriquecida en lípidos polares de aceite de krill.

Como era de esperar, los tejidos adiposos (TAV y TAS mostraron los valores más elevados (~75% y 55% respectivamente), que fueron comparables a los reportados por Diniz *et al* (2012), quienes mostraron un contenido de aproximadamente 80% en grasa intraabdominal de ratas Wistar.

En cuanto al contenido total en lípidos plasmáticos, se obtuvo ~0.6% (g/100mL plasma), en acuerdo con los valores obtenidos por Yu-Hong *et al* (2016), que mostraron un porcentaje en plasma entre 0.4%-0.5% en los AG totales analizados de ratas de distinto género. Este contenido plasmático de aproximadamente un 0.6% también fue reportado por Villanueva *et al.*, (2011) en ratones. Del mismo modo, Colina-Coca *et al.*, (2014), mostraron la distribución de AG en varios tejidos de ratas Wistar, entre ellos, reportaron el contenido total en AG de plasma y Erit, cuyos valores se encontraron entre un 0.4% y 0.6%, acorde con los obtenidos en el presente estudio.

Por otro lado, el contenido graso de las distintas partes de cerebro estudiadas (CF, CT, CO, HP y CB), se encontró en un rango de entre 6.5% a 8.5% que también está de acuerdo con los valores reportados por Chavko *et al.*, (1993), que obtuvo un rango de 5.3% a 7.3% (p/p) en el análisis de CF, corteza entorrinal (situada en el CT), HP y CB de ratas Wistar macho.

4.6. Composición lipídica del tejido adiposo superficial y visceral de los animales sometidos a estudio

El tejido adiposo es el mayor reservorio de energía, en forma de grasa, del organismo. Esta función, se realiza por las células características del tejido, los adipocitos, que cuentan en su citoplasma con una gran gota de grasa compuesta fundamentalmente por TG (Benkalfat *et al.*, 2011, Ibrahim, 2010, Lee *et al.*, 2013, Kotronen *et al.*, 2010). El TAS se distribuye alrededor de la superficie corporal en el tejido celular subcutáneo, mientras que el TAV se sitúa alrededor de los órganos. Entre los dos tipos de TA, el TAS contiene mayor número de adipocitos, debido a una mayor proporción de células más pequeñas (Walker *et al.*, 2007). El TAS está más densamente vascularizado que el TAV, si bien, este último, es más activo a nivel metabólico (Gealekman *et al.*, 2011). En esta línea, la relativa inactividad metabólica del TAS, lo convierte en el órgano principal de reserva de TG a largo plazo, y actúa como un regulador metabólico tanto en el exceso de energía, en el consumo de dietas con exceso de lípidos, como en situaciones de ayuno, hambre o ejercicio (McQuaid *et al.*, 2010). Además, el TAS se caracteriza por tener una pequeña tasa de infiltración de macrófagos, lo que supone una menor producción de citoquinas pro-inflamatorias en comparación con el TAV (Cancello *et al.*, 2006).

Composición en clases lipídicas (HPLC-ELSD)

La composición en CL del TAS y TAV de las ratas suplementadas se detalla en la Tabla 5.7. En cuanto a la distribución de CL de los dos tipos de tejido adiposo (TAS y TAV), ambos contenían principalmente TG (~99% respecto al contenido total en lípidos). No se observaron diferencias significativas entre los grupos de animales suplementados en su composición del TAS ni TAV ($p < 0.05$). Aunque la composición de los diferentes suplementos de cada dieta contenían una amplia variedad de CL (Tabla 5.3a.), este hecho no se ve reflejado en la distribución de CL de los tejidos adiposos puesto que en los adipocitos, la grasa se encuentra fundamentalmente en forma de TG.

Tabla 5.7. Clases lipídicas de tejido adiposo y tejido superficial de ratas suplementadas (g CL/100g grasa)

% CLASE LIPÍDICA	TEJIDO ADIPOSO SUPERFICIAL							
	Grupos suplementados							
	C		CMz		CAK		CMz+CAK	
	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE
EC	<0,2	-	<0,2	-	<0,2	-	<0,2	-
TG	99,78 ± 0,17		99,66 ± 0,45		99,26 ± 1,17		99,27 ± 1,11	
DG	<0,2	-	<0,2	-	<0,2	-	<0,2	-
AGL+Col	<0,2	-	<0,2	-	<0,2	-	<0,2	-

% CLASE LIPÍDICA	TEJIDO ADIPOSO VISCERAL							
	Grupos suplementados							
	C		CMz		CAK		CMz+CAK	
	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE
EC	<0,2	-	<0,2	-	<0,2	-	<0,2	-
TG	99,80 ± 0,16		99,83 ± 0,24		99,80 ± 0,23		99,73 ± 0,31	
DG	<0,2	-	<0,2	-	<0,2	-	0,20	-
AGL+Col	<0,2	-	<0,2	-	<0,2	-	<0,2	-

EC: éster de colesterol, TG: triglicéridos, DG: diglicéridos, AGL+Col: ácidos grasos libres y colesterol, C: Control, CMz: concentrado de mazada, CAK; concentrado de aceite de krill.

Composición en ésteres metílicos de ácidos grasos (CG-MS)

La composición en EMAG de los tejidos adiposos obtenidos de las ratas suplementadas en distintos grupos, se detalla en las Tablas 5.8a. y 5.8b.

El análisis de la composición lipídica del TA es considerado una buena elección para llevar a cabo los estudios de consumo de grasa de la dieta debido a su lento recambio metabólico, así como su falta de perceptibilidad en enfermedades agudas (Baylin *et al*, 2002). En este sentido, los AG que no pueden ser sintetizados endógenamente, como los AG esenciales, así como los AG que se generan a partir de éstos, son los mejores candidatos para ser empleados analíticamente como biomarcadores de la ingesta. Entre ellos se encuentran los AGPI n-6 y n-3, AG *trans*, AG ramificados, o AG de cadena impar. Baylin *et al*, (2002), realizaron un estudio en humanos en el que correlacionaron el aporte de determinados AG de la dieta con el perfil en EMAG de TA. Observaron una relación directa entre los AG con mayor contenido en la dieta, y los valores observados en TA. Este mismo comportamiento se observa en el presente estudio, en el que los AG C16, C18:1 c9 y C18:2 n-6, se encontraron, aproximadamente, en un 16%, 21% y 52% respectivamente en el pienso y en TAS y TAV con valores aproximados de 16%, 25% y 38% respectivamente.

Por otro lado, los resultados obtenidos también mostraron diferencias significativas en el contenido de los ácidos grasos n-6 y n-3 de TAS y TAV en función de la dieta de los animales. Así, el AG gamma-linolénico (C18:3 n-6), disminuyó significativamente en TAS y TAV con la suplementación de CMz, CAK y CMz+CAK (Figura 5.7.) Por otro lado, se observó un incremento significativo de los AG: EPA, DPA y DHA en el TAS del Grupo CMz+CAK respecto al Grupo C (en el caso de EPA y DHA) y al Grupo CMz (en el caso de EPA y DPA) ($p<0.05$). Cabe mencionar que en el Grupo CAK, también se observó una tendencia positiva en estos AG, aunque no se pudieron establecer diferencias significativas (Figura 5.8.).

Tabla 5.8a. Distribución de ésteres metílicos de ácidos grasos en ratas suplementadas (g EMAG/100g grasa) en tejido adiposo superficial (TAS) y visceral (TAV).

% EMAG	TEJIDO ADIPOSO SUPERFICIAL							
	Grupos suplementados							
	C		CMz		CAK		CMz+CAK	
	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE
C14	1,02 ± 0,20		1,04 ± 0,20		1,05 ± 0,16		1,05 ± 0,18	
C15	0,30 ± 0,06		0,26 ± 0,06		0,28 ± 0,05		0,30 ± 0,05	
C16	14,59 ± 2,72		15,35 ± 3,05		14,77 ± 3,05		16,04 ± 2,97	
C16:1	9,59 ± 3,04		9,35 ± 3,23		9,10 ± 3,23		7,90 ± 3,00	
C18	0,83 ± 0,45		1,02 ± 0,54		0,91 ± 0,52		1,18 ± 0,49	
C18:1c9	24,39 ± 2,06		23,54 ± 2,35		23,10 ± 2,20		22,92 ± 2,26	
C18:1c11	7,13 ± 0,98		6,66 ± 0,90		6,54 ± 0,72		6,82 ± 0,78	
C18:2 n6	38,05 ± 4,36		38,91 ± 4,36		39,71 ± 2,78		38,95 ± 4,62	
C18:3 n6	0,09 ± 0,03 a		0,05 ± 0,03 b		0,05 ± 0,01 b		0,06 ± 0,03 b	
C18:3 n3	0,79 ± 0,26		0,81 ± 0,47		1,07 ± 0,48		1,08 ± 0,45	
C20:1	0,23 ± 0,09		0,22 ± 0,20		0,24 ± 0,08		0,31 ± 0,13	
C20:4 n6	0,57 ± 0,27		0,67 ± 0,50		0,55 ± 0,16		0,56 ± 0,17	
C20:5 n3	0,04 ± 0,01 a		0,03 ± 0,01 a		0,07 ± 0,05		0,09 ± 0,04 b	
C22:5 n3	0,20 ± 0,08		0,16 ± 0,05 a		0,26 ± 0,10		0,28 ± 0,13 b	
C22:6 n3	0,22 ± 0,08 a		0,22 ± 0,10		0,32 ± 0,09		0,33 ± 0,14 b	
AGS	17,20 ± 3,27		18,04 ± 3,55		17,42 ± 3,49		19,03 ± 3,40	
AGMI	42,46 ± 5,42		40,78 ± 5,40		40,10 ± 4,37		39,07 ± 5,55	
AGPI	40,29 ± 4,50		41,16 ± 4,42		42,46 ± 2,95		41,86 ± 4,59	
n6	38,82 ± 4,34		39,72 ± 4,26		40,44 ± 2,85		39,73 ± 4,61	
n3	1,17 ± 0,42		1,16 ± 0,51		1,65 ± 0,65		1,70 ± 0,70	
ΣAGr	0,40 ± 0,03		0,32 ± 0,02		0,40 ± 0,04		0,40 ± 0,07	
ΣAGt	0,73 ± 0,17		0,66 ± 0,14		0,64 ± 0,12		0,64 ± 0,11	
ΣAGm	0,38 ± 0,05		0,39 ± 0,05		0,36 ± 0,03		0,40 ± 0,04	

AGS: ácidos grasos saturados, AGMI: ácidos grasos monoinsaturados, AGPI: ácidos grasos poliinsaturados AGr: ácidos grasos ramificados, AGt: ácidos grasos *trans*, AGm: ácidos grasos minoritarios. C: Grupo Control, CMz: Grupo concentrado de mazada, CAK: Grupo concentrado de aceite de krill. Letras a la derecha de los valores, indican diferencias significativas entre Grupos suplementados ($p<0.05$).

CAPÍTULO V

Tabla 5.8b. Distribución de ésteres metílicos de ácidos grasos en ratas suplementadas (g EMAG/100g grasa) en tejido adiposo visceral (TAV).

% EMAG	TEJIDO ADIPOSO VISCERAL							
	Grupos suplementados							
	C		CMZ		CAK		CMz+CAK	
	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE
C14	1,02 ± 0,23		0,90 ± 0,20		0,97 ± 0,25		1,02 ± 0,18	
C15	0,31 ± 0,08		0,26 ± 0,07		0,28 ± 0,05		0,31 ± 0,05	
C16	18,70 ± 1,75		17,82 ± 2,68		17,75 ± 2,33		19,51 ± 3,63	
C16:1	6,44 ± 2,61		5,95 ± 3,43		6,10 ± 2,21		5,11 ± 1,94	
C18	1,23 ± 0,28		1,22 ± 0,50		1,28 ± 0,47		1,52 ± 0,39	
C18:1c9	25,50 ± 2,89		23,40 ± 3,15		22,73 ± 1,96		20,57 ± 5,61	
C18:1c11	6,49 ± 0,87		6,46 ± 1,18		6,30 ± 0,68		6,37 ± 0,77	
C18:2 n6	35,84 ± 7,21		40,70 ± 5,42		40,36 ± 4,56		41,64 ± 5,76	
C18:3 n6	0,10 ± 0,03 a		0,04 ± 0,01 b		0,05 ± 0,01 b		0,05 ± 0,02 b	
C18:3 n3	0,83 ± 0,26		0,90 ± 0,53		1,17 ± 0,39		1,14 ± 0,41	
C20:1	0,27 ± 0,10		0,20 ± 0,14		0,24 ± 0,09		0,31 ± 0,13	
C20:4 n6	0,40 ± 0,17		0,32 ± 0,13		0,38 ± 0,13		0,35 ± 0,13	
C20:5 n3	0,04 ± 0,01		0,03 ± 0,02 a		0,10 ± 0,05 b		0,08 ± 0,05	
C22:5 n3	0,16 ± 0,09		0,11 ± 0,05		0,23 ± 0,13		0,23 ± 0,15	
C22:6 n3	0,17 ± 0,08		0,13 ± 0,05		0,28 ± 0,13		0,44 ± 0,59	
AGS	21,77 ± 1,92		20,60 ± 3,05		20,73 ± 2,85		22,85 ± 3,89	
AGMI	40,35 ± 6,44		36,88 ± 7,02		36,28 ± 3,86		32,83 ± 7,55	
AGPI	37,89 ± 6,95		42,56 ± 5,73		43,05 ± 4,11		44,45 ± 5,68	
n6	36,42 ± 7,01		41,13 ± 5,44		40,91 ± 4,49		42,12 ± 5,64	
n3	1,14 ± 0,38		1,12 ± 0,60		1,69 ± 0,62		1,81 ± 0,77	
ΣAGr	0,42 ± 0,07		0,30 ± 0,04		0,36 ± 0,06		0,36 ± 0,07	
ΣAGt	0,80 ± 0,23		0,66 ± 0,15		0,64 ± 0,10		0,64 ± 0,09	
ΣAGm	0,70 ± 0,09		0,57 ± 0,07		0,66 ± 0,06		0,73 ± 0,11	

AGS: ácidos grasos saturados, AGMI: ácidos grasos monoinsaturados, AGPI; ácidos grasos poliinsaturados AGr: ácidos grasos ramificados, AGt: ácidos grasos *trans*, AGm; ácidos grasos minoritarios. C: Grupo Control, CMz: Grupo concentrado de mazada, CAK: Grupo concentrado de aceite de krill. Letras a la derecha de los valores, indican diferencias significativas entre Grupos suplementados ($p<0.05$).

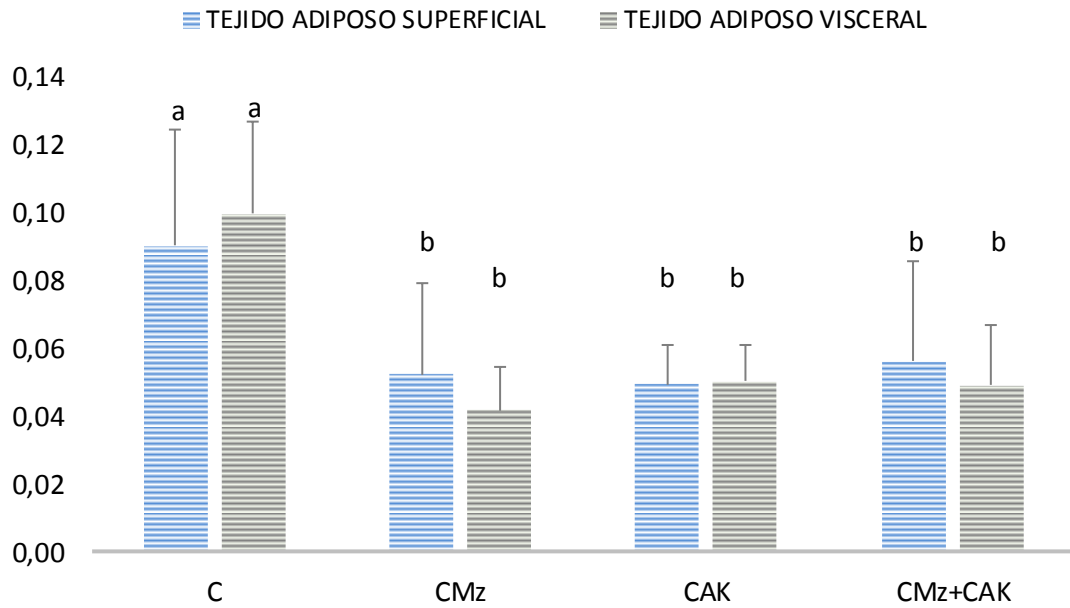
C18:3 N-6

Figura 5.7. Contenido de C18:3 n-6 en los grupos suplementados en tejido adiposo superficial y tejido adiposo visceral (g/100g grasa). C: Grupo Control, CMz: Grupo concentrado de mazada, CAK: Grupo concentrado de aceite de krill. Letras diferentes marcan diferencias significativas entre los grupos suplementados para un mismo tejido ($p < 0.05$).

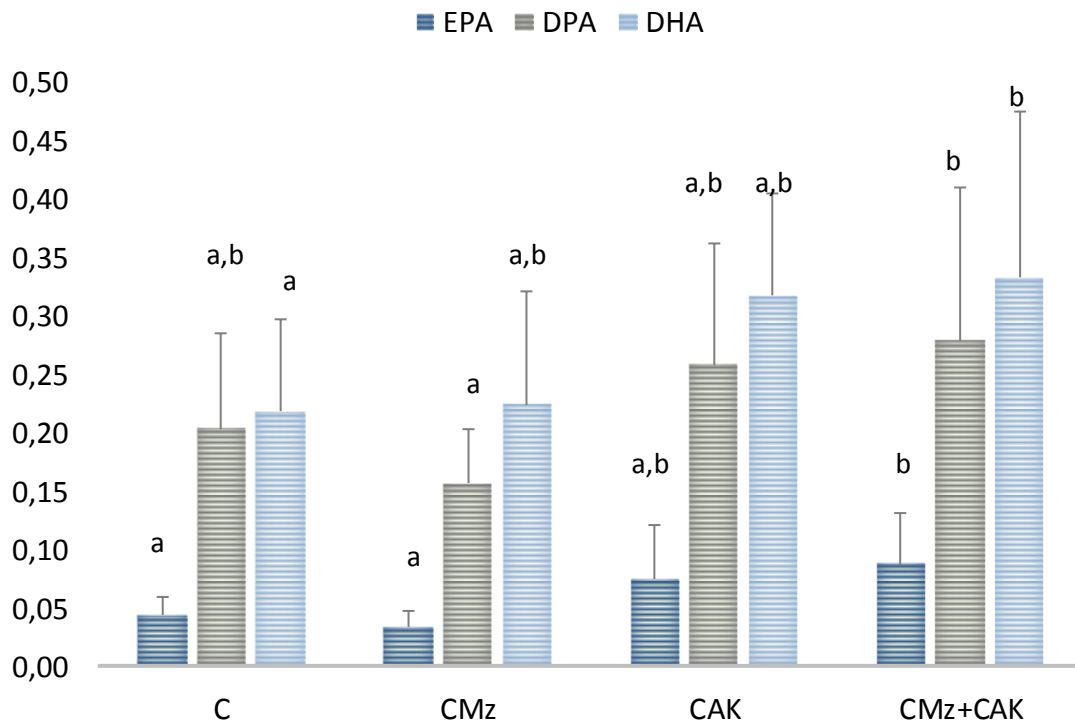


Figura 5.8. Contenido en EPA, DPA y DHA en tejido adiposo superficial de los grupos suplementados (g/100g grasa). C: Grupo Control, CMz: Grupo concentrado de mazada, CAK: Grupo concentrado de aceite de krill. Letras diferentes marcan diferencias significativas entre los grupos suplementados para un mismo AG ($p < 0.05$).

En relación con los resultados obtenidos en el TAV, la elevada dispersión de los contenidos en EPA, DPA y DHA entre los animales de los diferentes grupos suplementados mostraron tendencias en valores ascendentes en los grupos suplementados con CAK y CAK+CMz, pero no permitieron observar diferencias significativas entre ellos (Figura 5.9.).

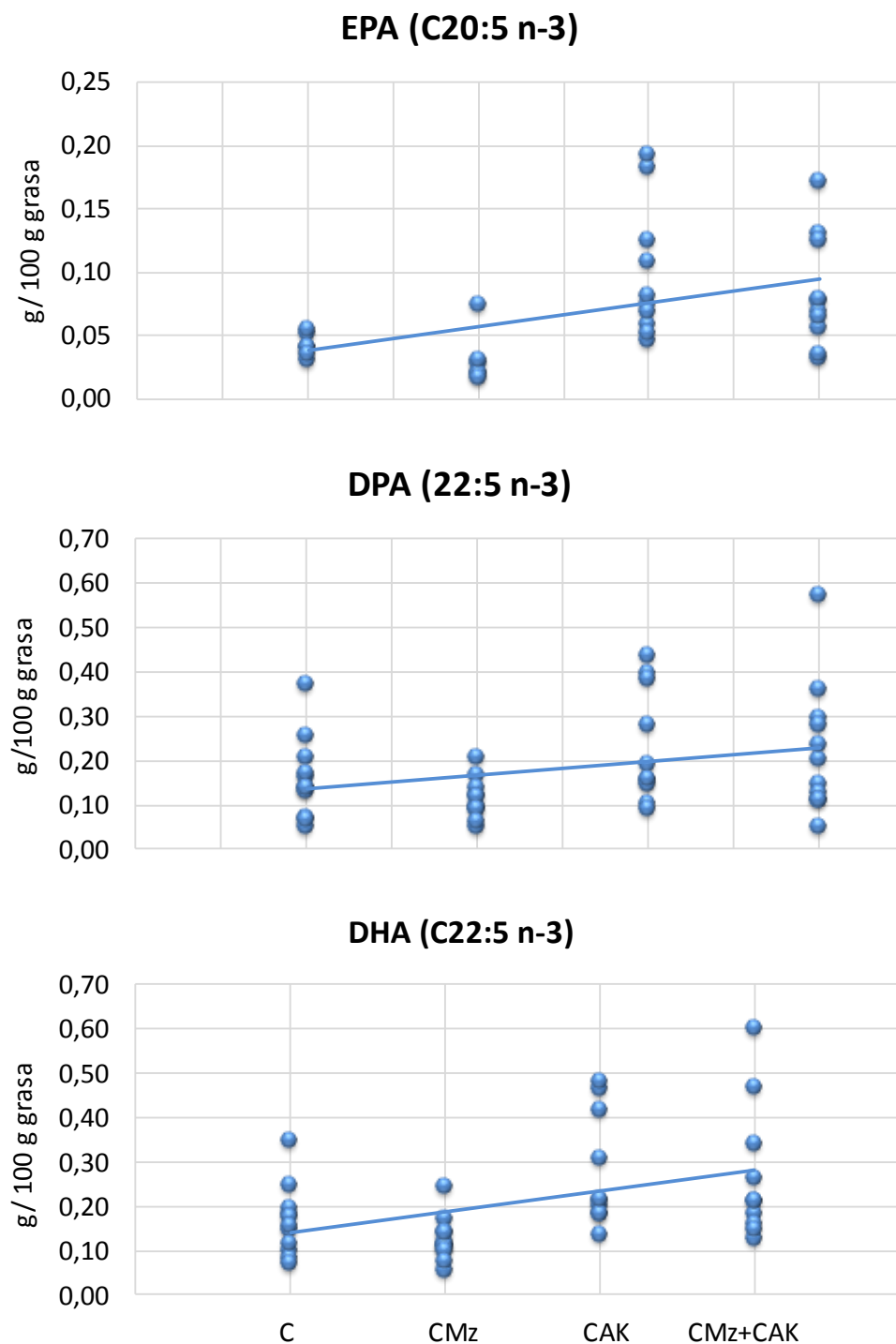


Figura 5.9. Dispersión de los animales alimentados con las diferentes dietas suplementadas y línea de tendencia en el contenido de EPA, DPA y DHA del tejido adiposo visceral.

Enser *et al* (2000) suministraron 2 tipos de dietas a cerdos en las que el grupo experimental fue suplementado con lino, lo que se reflejó en un incremento del contenido en AG n-3 como AAL, DPA y DHA y una disminución del contenido de AL y AA en TA, respecto a la dieta del grupo control. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos en el presente trabajo para las dietas que se suplementan con CAK. En esta misma línea, Martins *et al.* (2010) también observaron modificaciones en el perfil de AG de TA epididimal de ratas macho Zucker con el aporte de una dieta sin ácido linoleico conjugado (CLA) y otras 3 dietas que incorporaban CLA en diferentes dosis, donde se vio que el incremento de este AG en la dieta se correlacionó con el incremento de CLA del TA epididimal. Zhou *et al* (2013) también observaron el efecto de la ingesta sobre el perfil lipídico de TAV, al obtener un incremento del 55% en AL en la composición lipídica del TAV de ratas suplementadas con aceite de maíz (que contiene AL como AG principal), respecto a dietas suplementadas con grasa láctea anhidra y MGGL, con menores contenidos de AL respecto al aceite de maíz.

En cuanto a la composición de AG de TAS y TAV del presente estudio, no se encontraron diferencias significativas en el resto de AG entre los diferentes grupos de dietas suplementadas con los complementos ricos en LP administrados a los animales.

4.7. Composición lipídica del hígado de los animales sometidos a estudio

El H juega un papel determinante en el metabolismo lipídico, ya que es el centro en el que se desarrolla la síntesis de ácidos grasos y de lipoproteínas que ejercen funciones de transportadores de lípidos por la sangre hasta la célula o el tejido diana (Nguyen *et al*, 2008). El H también ejerce funciones en la homeostasis energética del organismo debido a su capacidad para metabolizar glucosa y ácidos grasos. De este modo, cuando la ingesta de energía es abundante, los mamíferos consumen preferentemente carbohidratos para generar ATP y excedente de glucosa. Una vez repuestos los depósitos de glucosa (en forma de glucógeno), es transformada en AG mediante la lipogénesis. Estos AG son empleados posteriormente en la síntesis y almacenamiento de TG en el TA. En este sentido, cabe destacar que, a pesar de que las funciones de reserva energética en forma de TG se realizan principalmente por el TA, el H también tiene la capacidad de almacenar lípidos cuando se produce un consumo excesivo y prolongado de energía, hecho que podría desencadenar el desarrollo de esteatosis hepática (Reddy *et al.*, 2006).

Composición en clases lipídicas (HPLC-ELSD)

La composición en CL del H de las ratas se detalla en Tabla 5.9.

Tabla 5.9. Contenido en clases lipídicas de hígado (H) de los animales alimentados con las diferentes dietas suplementadas (g/100g grasa).

% Clase lipídica (g/ 100g grasa)	HÍGADO							
	Grupos suplementados							
	C		CMz		CAK		CMz+CAK	
	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE
EC	2,43 ±	1,51	2,78 ±	1,55	4,41 ±	8,95	2,74 ±	3,00
TG	32,98 ±	13,92	32,13 ±	13,48	31,44 ±	14,19	30,75 ±	14,63
DG	6,67 ±	6,23	5,47 ±	7,85	4,98 ±	4,45	7,90 ±	5,37
AGL+Col	15,50 ±	13,92	10,58 ±	9,66	12,92 ±	11,88	12,97 ±	7,20
MG	0,67 ±	0,82	0,90 ±	1,49	0,96 ±	1,19	1,02 ±	1,40
AF	0,17 ±	0,24	0,05 ±	0,05	0,41 ±	0,36	0,26 ±	0,15
FE	8,69 ±	7,08	10,99 ±	7,23	7,81 ±	4,22	7,29 ±	5,40
FI	1,26 ±	1,20	1,23 ±	1,22	1,85 ±	1,65	1,98 ±	1,75
FS	0,37 ±	0,69	0,76 ±	1,45	0,50 ±	0,54	0,29 ±	0,17
FC	29,55 ±	10,14	34,23 ±	12,72	33,13 ±	7,24	32,83 ±	10,71
EM	1,65 ±	1,43	1,66 ±	1,72	2,16 ±	1,91	2,09 ±	1,29
Σ LP	41,52 ±	16,56	48,87 ±	18,03	45,40 ±	9,67	44,36 ±	14,68

EC: éster de colesterol, TG: triglicéridos, DG: diglicéridos, AGL+Col: ácidos grasos libres y colesterol, MG: monoglicéridos, AF: ácido fosfatídico, FE: fosfatidiletanolamina, FI: fosfatidilinositol, FS: fosfatidilserina, FC: fosfatidilcolina, EM: esfingomielina, LP: lípidos polares. C: Grupo Control, CMz: Grupo concentrado de mazada, CAK: Grupo concentrado de aceite de krill ($p<0.05$).

En el presente estudio, la distribución de las CL del H presentó un perfil en el que TG y FC fueron los componentes mayoritarios constituyendo, aproximadamente, un 30% cada uno sobre el total de grasa. Nardelli *et al.*, (2011) reportaron una composición similar de TG en H de ratas Wistar con valores de ~25% (g TG/100g grasa). Del mismo modo, Rajasekaran *et al.* (2006) reportaron un contenido total de FL en H de ratas Wistar de ~46%, lo que está de acuerdo con los valores obtenidos en el presente estudio (41-49%). En cuanto al contenido en la fracción de AGL+Col, se obtuvo un valor aproximado al 15%, por lo que fue la 3ª clase lipídica mayoritaria, cuyo valor vendría dado fundamentalmente por el Col ya que la composición lipídica del H, contiene trazas de AGL (Christie y Han, 2010). Los resultados obtenidos en el presente estudio no presentaron diferencias significativas entre ninguno de los grupos de dietas estudiados. Sin embargo, otros autores como Watanabe *et al* (2010), que suplementaron la dieta de ratones con LP lácteos obtenidos a partir de un concentrado

lipídico de *butterserum* (CL-BS) (subproducto obtenido del lavado del grano de mantequilla), diferenciando 3 dietas a partir de diferentes fracciones de este ingrediente (una fracción enriquecida en las ceramidas (Glucer y LacCer), otra en FE y FC y otra en EM del CL-BS), observaron una disminución de TG en la dieta suplementada con el CL-BS respecto al placebo, sólo cuando la fracción estaba enriquecida en ceramidas. En nuestro estudio, la composición en LP del H de los animales suplementados no se vio afectada por la diferente composición del complemento nutricional (Tabla 5.5.). Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos recientemente por Aoum *et al.* (2012), que compararon dietas cuyo contenido en grasa fue del 5% o del 30%, así como el tipo de grasa administrada en ambas dosis (dieta basal -aceite de girasol, colza y manteca-, manteca, o aceite de pescado) y no obtuvieron diferencias en la composición mitocondrial de LP (FC, FE, FI, FS, EM) en el hígado de ratas Wistar.

Composición en ésteres metílicos de ácidos grasos (CG-MS)

Como se ha indicado anteriormente, el H es un importante regulador del flujo de metabolitos en el organismo al estar conectado vía vena porta con el intestino y con la circulación general vía arteria hepática y sistema linfático. En este sentido, los lípidos llegan a la superficie de los hepatocitos en forma de AGL plasmáticos o transportados en lipoproteínas que liberan AGL por efecto de la lipasa hepática para introducirse en el hepatocito, donde pueden oxidarse para obtener energía, o ser reesterificados en TG (Bardbury, 2006). De este modo, el hígado juega un papel fundamental en el metabolismo lipídico como centro de síntesis de AG y circulación de los lípidos mediante la síntesis de lipoproteínas (Nguyen *et al.*, 2008).

En cuanto a la composición en AG del H de los animales tras la suplementación de las diferentes dietas, se muestra en la Tabla 5.10.

Como puede observarse, los AG mayoritarios en H fueron el C16:0, C18:1 n9, C18:2 n-6 (AL) y C20:4 n-6 (AA). En esta misma línea, Vigerust *et al.*, (2013) reportaron una composición en AG de H de ratones con una distribución que contenía principalmente los mismos AG mencionados anteriormente. En el presente estudio se observaron diferencias significativas en el contenido de AL de los animales del grupo CMz con el Grupo CMz+CAK (23.2% vs. 16.3%), por lo que también se observó en el total de los AG n-6 (Figura 5.10.).

CAPÍTULO V

Tabla 5.10. Distribución de ésteres metílicos de ácidos grasos (EMAG) de hígado de las ratas suplementadas (g/100g grasa).

% EMAG	HÍGADO							
	Grupo suplementado							
	C		CMz		CAK		CMz+CAK	
	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE
C14	1,01 ±	0,31	0,78 ±	0,18	0,84 ±	0,23	0,98 ±	0,49
C15	0,41 ±	0,12	0,36 ±	0,14	0,37 ±	0,09	0,48 ±	0,16
C16	30,19 ±	6,54	27,45 ±	4,62	29,72 ±	5,76	33,91 ±	8,04
C16:1	5,36 ±	1,68	4,13 ±	1,82	4,22 ±	1,57	4,79 ±	1,93
C17	0,40 ±	0,11	0,41 ±	0,17	0,39 ±	0,07	0,50 ±	0,17
C18	10,36 ±	2,61	10,28 ±	3,09	12,28 ±	4,40	13,12 ±	4,81
C18:1c9	12,47 ±	2,07	11,26 ±	5,38	10,81 ±	2,30	11,91 ±	3,12
C18:1c11-13	6,96 ±	1,08	6,31 ±	1,16	5,84 ±	1,06	6,89 ±	1,64
C18:2 n6	18,58 ±	4,35	23,19 ±	5,39 a	22,04 ±	6,89	16,27 ±	6,40 b
C18:3 n6	0,23 ±	0,09	0,11 ±	0,06	0,14 ±	0,10	0,11 ±	0,07
C18:3 n3	0,32 ±	0,16	0,25 ±	0,15	0,33 ±	0,18	0,28 ±	0,27
C20:3 n6	0,50 ±	0,30	0,43 ±	0,25	0,42 ±	0,18	0,38 ±	0,38
C20:4 n6	8,46 ±	5,95	10,16 ±	4,92	7,54 ±	3,04	5,54 ±	5,95
C20:5 n3	0,17 ±	0,10	0,24 ±	0,15	0,36 ±	0,23	0,41 ±	0,55
C24	0,79 ±	0,28	0,64 ±	0,51	0,53 ±	0,51	0,55 ±	0,34
C22:5 n3	0,45 ±	0,32	0,56 ±	0,29	0,55 ±	0,24	0,88 ±	0,86
C22:6 n3	1,80 ±	1,52	2,36 ±	1,70	2,06 ±	0,81	1,84 ±	2,33
AGS	43,40 ±	9,53	40,01 ±	8,03	44,56 ±	9,17	49,99 ±	12,82
AGMI	26,16 ±	4,28	23,00 ±	6,37	22,26 ±	4,26	25,25 ±	5,54
AGPI	30,74 ±	12,19	37,54 ±	8,91	33,74 ±	10,43	25,44 ±	14,84
n6	27,69 ±	10,06	33,89 ±	7,24 a	30,12 ±	9,23	22,26 ±	11,50 b
n3	2,47 ±	1,90	3,04 ±	2,14	2,98 ±	1,13	2,63 ±	3,49
ΣAGr	0,56 ±	0,13	0,38 ±	0,13	0,51 ±	0,18	0,54 ±	0,15
ΣAGt	0,49 ±	0,13	0,50 ±	0,06	0,48 ±	0,08	0,58 ±	0,08
ΣAGm	0,93 ±	0,14	0,72 ±	0,09	0,64 ±	0,07	0,68 ±	0,08

AGS: ácidos grasos saturados, AGMI: ácidos grasos monoinsaturados, AGPI; ácidos grasos poliinsaturados AGr: ácidos grasos ramificados, AGt: ácidos grasos *trans*, AGm; ácidos grasos minoritarios. C: Grupo Control, CMz: Grupo concentrado de mazada, CAK: Grupo concentrado de aceite de krill. Letras a la derecha de los valores, indican diferencias significativas entre Grupos suplementados ($p < 0.05$).

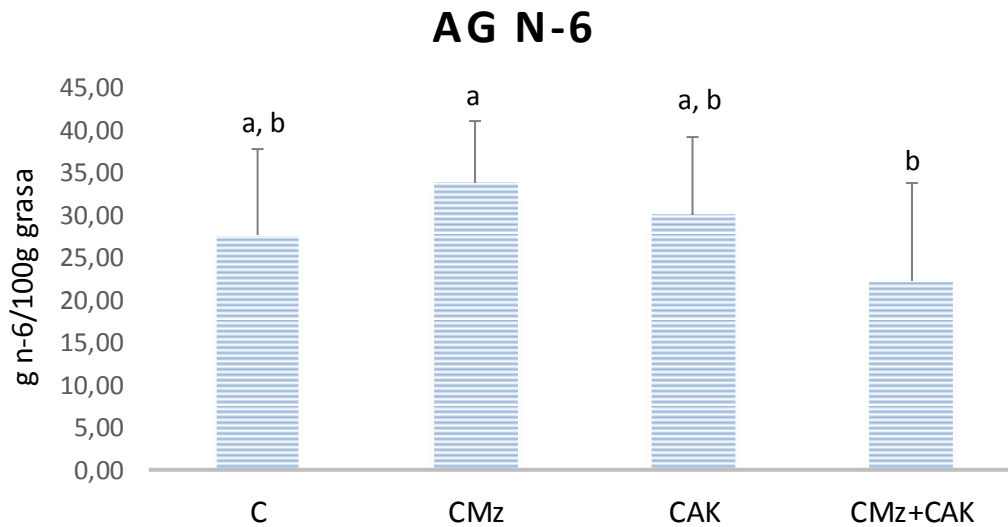


Figura 5.10. Contenido de ácidos grasos n-6 totales en H de los grupos suplementados. C: Grupo Control, CMz: Grupo concentrado de mazada, CAK: Grupo concentrado de aceite de krill. Letras diferentes, indican diferencias significativas entre Grupos suplementados ($p < 0.05$).

En el estudio realizado por Watanabe *et al.* (2010) no encontraron diferencias en el perfil lipídico de AG del H respecto al grupo control (suplementado con aceite de soja) en las fracciones de CL-BS anteriormente descritas, a pesar del diferente contenido en AL (52% en aceite de soja respecto a 2-10% en las fracciones del CL-BS). Si bien, cabe mencionar que, de los 4 complementos nutricionales empleados en el presente estudio, el Grupo CMz contenía la mayor proporción de AL en el complemento con un 8.7% (Tabla 5.3b). En este sentido, en otro estudio citado anteriormente realizado por Zhou *et al.*, (2013), observaron el mayor contenido de AL en H de ratas suplementadas con aceite de maíz, seguido del grupo suplementado con MGGL, respecto al perfil obtenido de las ratas suplementadas con MA. Esta diferente proporción del AL entre las dietas, también se presentó en la composición de las mismas, donde el aceite de maíz, tenía el mayor contenido en AL. Por otro lado, como ya se ha observado en otros tejidos, la disminución del contenido en AGPI n-6, parece estar relacionada con la suplementación de AGPI n-3 en la dieta, debido a la relación metabólica de estos ácidos grasos esenciales en el organismo al compartir el mismo conjunto de enzimas durante su conversión, como ya ha sido citado en la introducción (capítulo I). Así, el menor contenido de AL y el total de AG n-6 del Grupo CMz+CAK en H (Figura 5.9.), podría venir dado por el aporte de AGPI n-3 de la suplementación de CAK. Estos resultados estarían de acuerdo con los aportados por Vigerust *et al* (2013), que observaron que la suplementación tanto con aceite de pescado, como con AK en

ratones, disminuyó el porcentaje de AG n-6 en H respecto a una dieta control sin aporte de EPA/DHA. Resultados muy similares se obtuvieron en la determinación de AG de H de ratas Wistar suplementadas con AG n-3 de aceite de pescado realizada por Lamaziere *et al.* (2013), que reportaron la disminución de AG C18:3 n-6 y C20:4 n-6 en el grupo experimental respecto al control, además del incremento de EPA y DHA, aunque no se mostraron diferencias en otros AG n-6 como el AL.

4.8. Composición del perfil lipídico de eritrocitos y plasma de los animales sometidos a estudio

Composición en clases lipídicas (HPLC-ELSD)

La composición en CL obtenida de Erit y Plasma de los distintos grupos suplementados se muestra en la Tabla 5.11.

➤ Eritrocitos

Los lípidos de los Erit en mamíferos, se encuentran fundamentalmente en la membrana celular, constituida por aproximadamente un 50% de lípidos y un contenido similar de proteínas. Además, este hecho hace que en la composición de los Erit, los LP junto con el Col libre, sean los componentes lipídicos mayoritarios en una proporción equitativa (Shohet, 2012). Por otro lado, el estudio de la composición lipídica de los Erit ha alcanzado un gran interés por contener biomarcadores lipídicos de la que reflejan la ingesta de grasa a medio plazo debido a su tiempo de intercambio, que ha sido establecido, en el caso de ratas, en aproximadamente 60 días (Arab, 2003).

Respecto a los resultados obtenidos en el presente estudio, la composición lipídica de los Erit mostraron una distribución de CL que se ajusta con lo descrito anteriormente, con un perfil compuesto por LP y Col, con una distribución equitativa entre ambas CL (Tabla 5.11a.). No se encontraron diferencias significativas en las CL de los Erit entre los diferentes Grupos suplementados estudiados ($p < 0.05$).

Tabla 5.11a. Composición en clases lipídicas de eritrocitos de los grupos suplementados (g/100g grasa).

% CLASE LIPÍDICA	ERITROCITOS							
	Grupos suplementados							
	C		CMz		CAK		CMZ+CAK	
	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE
EC	2,31 ±	1,96	4,32 ±	4,87	2,03 ±	1,96	1,74 ±	1,15
TG	10,93 ±	6,88	7,36 ±	4,04	8,37 ±	6,83	5,91 ±	4,50
DG	3,09 ±	3,58	3,60 ±	3,82	3,88 ±	3,85	3,95 ±	3,72
AGL+Col	47,57 ±	14,27	41,43 ±	4,56	39,30 ±	8,60	43,48 ±	10,04
MG	3,28 ±	5,25	2,24 ±	1,85	3,15 ±	2,65	4,38 ±	3,84
AF	<0,2	-	<0,2	-	<0,2	-	<0,2	-
FE	4,45 ±	4,90	5,80 ±	6,18	3,47 ±	4,59	2,99 ±	3,28
FI	0,54 ±	0,54	0,76 ±	0,67	0,96 ±	0,72	0,59 ±	0,38
FS	0,42 ±	0,26	0,96 ±	1,09	0,63 ±	0,42	0,38 ±	0,16
FC	23,23 ±	10,51	29,17 ±	5,68	31,94 ±	6,60	32,46 ±	7,27
EM	3,98 ±	2,65	4,45 ±	1,79	6,65 ±	4,47	5,62 ±	1,96
Σ LP	32,62 ±	14,74	40,89 ±	8,63	43,12 ±	11,02	40,94 ±	10,64

EC: éster de colesterol, TG: triglicéridos, DG: diglicéridos, AGL+Col: ácidos grasos libres y colesterol, MG: monoglicéridos, AF: ácido fosfatídico, FE: fosfatidiletanolamina, FI: fosfatidilinositol, FS: fosfatidilserina, FC: fosfatidilcolina, EM: esfingomielina, LP: lípidos polares. Grupo Control, CMz: Grupo concentrado de mazada, CAK: Grupo concentrado de aceite de krill. Letras diferentes a la derecha, marcan diferencias significativas entre los grupos suplementados ($p<0.05$).

➤ Plasma

Los lípidos plasmáticos son considerados importantes marcadores a corto plazo de la ingesta tanto lipídica, como de otros nutrientes de la dieta. Así, los quilomicrones plasmáticos reflejan la ingesta de la grasa de la dieta que entra directamente a la circulación enterohepática (Arab, 2003).

Respecto a la composición lipídica plasmática en el presente estudio (Tabla 5.11b.), los compuestos mayoritarios fueron los TG, FC y EC. Este mismo perfil ha sido reportado previamente en la cuantificación de clases lipídicas de plasma descrita por Christie y Han (2010). Por otro lado, la FC se encontró en menor proporción en los Grupos suplementados con CAK y CMZ+CAK respecto al grupo con CMz (Figura 5.11.), lo que supuso un contenido significativamente menor en los FL totales ($p<0.05$); sin embargo, no se observaron diferencias para el resto de CL entre los distintos grupos suplementados.

Tabla 5.11b. Composición en clases lipídicas de plasma de los grupos suplementados (g/100g grasa).

% CLASE LIPÍDICA	PLASMA							
	Grupos suplementados							
	C		CMz		CAK		CMz+CAK	
	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE
EC	14,60 ±	11,22	24,79 ±	7,36	28,97 ±	14,05	29,46 ±	19,67
TG	36,95 ±	21,63	38,80 ±	21,32	41,70 ±	22,87	42,32 ±	21,38
DG	1,99 ±	3,04	4,93 ±	7,16	3,12 ±	3,42	6,24 ±	7,64
AGL+Col	22,18 ±	20,87	14,53 ±	17,75	15,47 ±	18,73	10,60 ±	10,78
MG	0,59 ±	0,75	0,39 ±	0,60	0,36 ±	0,47	0,16 ±	0,23
AF	<0,2	-	<0,2	-	<0,2	-	<0,2	-
FE	1,65 ±	3,05	0,18 ±	0,30	0,25 ±	0,37	0,08 ±	0,16
FI	0,31 ±	0,25	0,44 ±	0,43	0,24 ±	0,21	0,30 ±	0,26
FS	0,39 ±	0,19	0,39 ±	0,09	0,44 ±	0,18	0,24 ±	0,20
FC	20,65 ±	4,46 a	15,80 ±	6,46	13,17 ±	4,78 b	12,47 ±	5,29 b
EM	1,85 ±	1,51	1,00 ±	0,63	1,14 ±	0,97	0,80 ±	0,47
Σ LP	24,73 ±	7,60 a	17,54 ±	6,48	14,83 ±	4,90 b	13,71 ±	5,58 b

EC: éster de colesterol, TG: triglicéridos, DG: diglicéridos, AGL+Col: ácidos grasos libres y colesterol, MG: monoglicéridos, AF: ácido fosfatídico, FE: fosfatidiletanolamina, FI: fosfatidilinositol, FS: fosfatidilserina, FC: fosfatidilcolina, EM: esfingomielina, LP: lípidos polares. Grupo Control, CMz: Grupo concentrado de mazada, CAK: Grupo concentrado de aceite de krill. Letras diferentes a la derecha, marcan diferencias significativas entre los grupos suplementados ($p<0.05$).

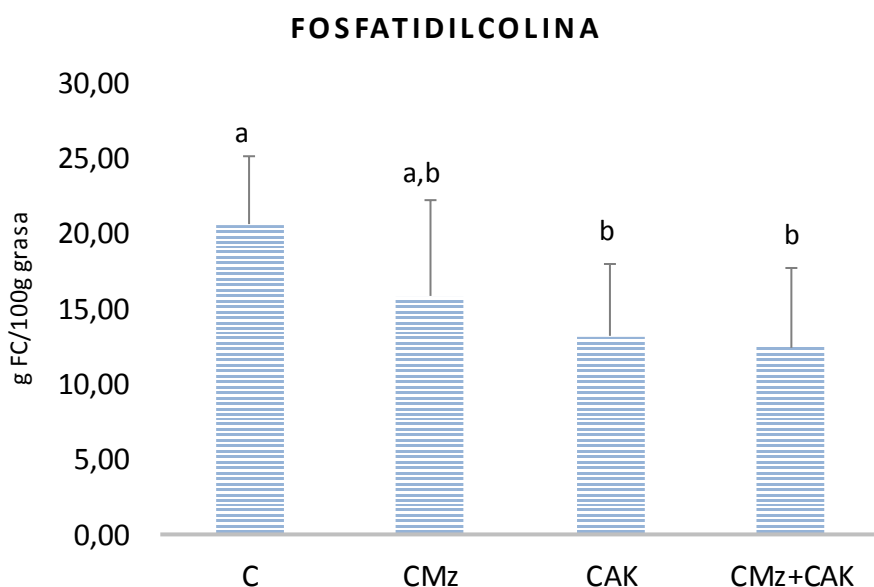


Figura 5.11. Contenido en fosfatidilcolina (FC) plasmática de los grupos suplementados (g/100g grasa). C: Grupo Control, CMz: Grupo concentrado de mazada, CAK: Grupo concentrado de aceite de krill. Letras diferentes marcan diferencias significativas entre los grupos suplementados ($p<0.05$).

En esta línea, Nestel *et al.* (2013), midieron los lípidos plasmáticos de humanos a los que se les proporcionó 3 tipos de dieta que incluían productos lácteos 1) fermentados (cheddar y yogur entero), 2) no fermentados (nata, mantequilla y helado) y 3) fermentados y bajos en grasa (leche 1% M.G., y yogur <1% M.G.). La ingesta de las diferentes dietas lácteas no provocó modificaciones significativas en Col total ni en TG presentes en el perfil lipídico plasmático de los voluntarios, aunque reportaron un menor contenido en FC y EM en aquellos que consumieron productos fermentados (ricos en grasa). Sin embargo, otros estudios como el realizado en humanos por Conway *et al.*, (2013), sí observaron un menor contenido en estas dos CL, Col y TG (entre otros parámetros), al suplementar la dieta con Mz (93mg/ día). Igualmente, en otros estudios donde suplementaron la dieta de ratones con un concentrado lipídico de *butterserum*, con un ~62% de LP en su composición lipídica total, observaron una disminución significativa del Col plasmático total, pero no hubo diferencias en el contenido plasmático de TG ni LP (Watanabe *et al.*, 2010). Vigerust *et al* (2013), también observaron la disminución de EC y Col libre en plasma de ratones, con la suplementación de AK y aceite de pescado respecto a la dieta control.

Por otro lado, son muchos los estudios que han confirmado la disminución del contenido plasmático de TG con el consumo de fuentes con EPA y DHA, sin embargo, parece fundamental en el control de estos estudios, la evaluación del tiempo de suplementación, así como la dosis suministrada, para poder confirmar este efecto. En este sentido, Berge *et al.* (2014), administraron diferentes dosis en humanos de AK (0.5g, 1g, 2g y 4g al día) durante 12 semanas. Los cambios ocurridos en el contenido de TG plasmáticos no fueron significativos con el consumo de 0.5g de AK en 6 ni 12 semanas, pero sí disminuyeron en aproximadamente un 20% cuando la suplementación se produjo a dosis superiores tras 6 semanas de tratamiento. Los resultados obtenidos a las 12 semanas de suplementación, sin embargo, no mostraron diferencias significativas respecto a los niveles de TG en los individuos del grupo que consumieron un placebo. En cuanto a la determinación de Col total, Col HDL y LDL del estudio descrito, tampoco mostraron diferencias significativas en ninguno de los grupos suplementados con AK respecto al grupo control.

Composición en ésteres metílicos de ácidos grasos por CG-MS

La composición en EMAG de Erit y Plasma se detalla en la Tabla 5.12a. y Tabla 5.12b. respectivamente.

➤ Eritrocitos

En el presente estudio, el perfil lipídico de eritrocitos mostró importantes diferencias en el contenido de algunos ácidos grasos, aunque debido a la gran variabilidad de los resultados entre individuos, sólo en algunos casos concretos fueron significativas. Los AG mayoritarios de los Erit observados en el presente estudio (Tabla 5.12a.), coinciden con los resultados reportados por autores como Letondor *et al.*, 2014; y Zhou *et al.*, 2013, que mostraron un contenido en AG de Erit en ratas donde los AG C16, C18, C18:1 n-9 (AO), C18:2 n-6 (AL) y C20:4 n-6 (AA), fueron los AG mayoritarios.

Tabla 5.12a. Distribución de ésteres metílicos de ácidos grasos (EMAG) de eritrocitos de los grupos estudiados.

%EMAG	Eritrocitos							
	Grupos suplementados							
	C		CMz		CAK		CMz+CAK	
	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE
C14	0,60 ± 0,39		0,73 ± 0,36		0,77 ± 0,22		0,77 ± 0,20	
C15	0,40 ± 0,29		0,51 ± 0,26		0,58 ± 0,13		0,61 ± 0,18	
DMA16	2,40 ± 1,49		1,42 ± 0,42		1,44 ± 0,36		0,95 ± 0,57	
C16	31,82 ± 10,27 a		37,12 ± 6,57		46,49 ± 7,85 b		43,10 ± 8,18	
C16:1	2,25 ± 1,59		1,88 ± 0,57		2,40 ± 0,85		2,66 ± 1,09	
DMA18	1,21 ± 0,27		1,29 ± 0,35		1,20 ± 0,21		0,96 ± 0,28	
C17:1	0,65 ± 0,25		0,45 ± 0,17		0,34 ± 0,16 a		0,32 ± 0,14 b	
C18	12,90 ± 3,81		12,94 ± 3,23		12,73 ± 3,22		13,01 ± 4,03	
C18:1c9	14,00 ± 2,56		10,68 ± 2,90		10,39 ± 3,12		11,81 ± 2,21	
C18:1c11	4,82 ± 1,27		4,77 ± 0,95		5,15 ± 1,03		5,24 ± 0,80	
C18:2 n6	9,52 ± 8,06		14,94 ± 4,69		11,31 ± 6,21		12,88 ± 6,21	
C18:3 n3	0,85 ± 0,67		0,45 ± 0,37		0,94 ± 0,70		0,23 ± 0,11	
C20:1	0,46 ± 0,16 a		0,17 ± 0,04 b		0,29 ± 0,20		0,22 ± 0,04 b	
C20:3 n6	0,38 ± 0,17 a		0,12 ± 0,05 b		0,14 ± 0,08 b		0,19 ± 0,08 b	
C20:4 n6	8,14 ± 4,27		8,73 ± 7,32		3,91 ± 5,94		3,69 ± 3,01	
C24	0,48 ± 0,30		0,64 ± 0,45		0,69 ± 0,24		0,53 ± 0,20	
C22:5 n3	0,22 ± 0,22		0,32 ± 0,31		0,67 ± 0,70		0,36 ± 0,36	
C22:6 n3	4,54 ± 5,04		0,67 ± 0,64		1,22 ± 1,35		0,71 ± 0,80	
AGS	51,92 ± 8,55		55,80 ± 9,29		64,83 ± 10,37		61,05 ± 11,10	
AGMI	23,22 ± 2,65 a		18,31 ± 3,81 b		18,70 ± 3,99 b		20,67 ± 2,36	
AGPI	24,05 ± 8,40		25,87 ± 12,80		16,47 ± 14,06		18,23 ± 9,83	
n6	17,44 ± 8,50		23,85 ± 11,51		15,32 ± 11,99		16,81 ± 8,94	
n3	5,60 ± 5,55		1,44 ± 1,12		2,83 ± 2,75		1,16 ± 1,04	
ΣAGr	0,65 ± 0,23		0,30 ± 0,49		0,36 ± 0,08		0,36 ± 0,07	
ΣAGt	0,51 ± 0,14		0,35 ± 0,06		0,33 ± 0,05		0,43 ± 0,16	
ΣAGm	0,36 ± 0,08		0,24 ± 0,05		0,29 ± 0,07		0,28 ± 0,06	

AGS: ácidos grasos saturados, AGMI: ácidos grasos monoinsaturados, AGPI: ácidos grasos poliinsaturados AGr: ácidos grasos ramificados, AGt: ácidos grasos *trans*, AGm: ácidos grasos minoritarios. C: Grupo Control, CMz: Grupo concentrado de mazada, CAK: Grupo concentrado de aceite de krill. Letras a la derecha de los valores, indican diferencias significativas entre Grupos suplementados ($p < 0.05$).

En el presente estudio se observó una disminución significativa del contenido en C20:3 n-6 en todas las dietas experimentales respecto al Grupo C, aunque los valores mostrados estaban por debajo de 0.5% del total de AG (Tabla 5.12a y Figura 5.12), sin embargo, no se encontró una disminución de AA con la suplementación de los grupos CMz y CAK.

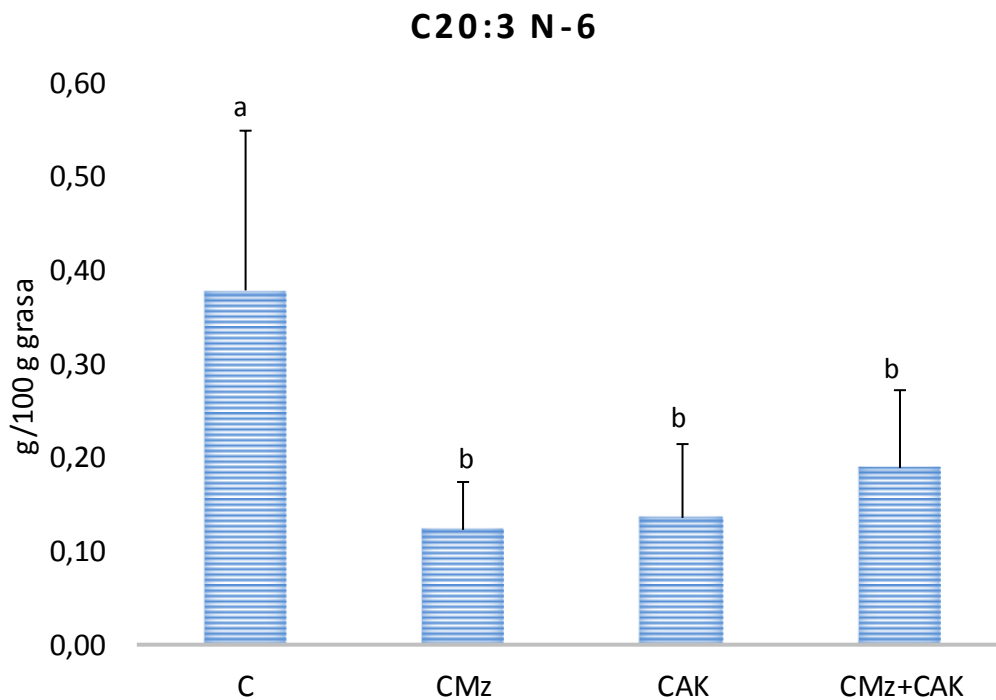


Figura 5.12. Contenido de C20:3 n-6 en eritrocitos de los grupos suplementados. C: Grupo Control, CMz: Grupo concentrado de mazada, CAK: Grupo concentrado de aceite de krill. Letras diferentes marcan diferencias significativas respecto a los grupos para un mismo tejido ($p < 0.05$).

En un estudio reportado por Zhou *et al.* (2013), determinaron la influencia de la ingesta de diferentes tipos de dieta en ratas durante 12 semanas, cuya formulación sólo variaba en la fuente de grasa (aceite de maíz, mantequilla anhidra -MA- y mantequilla anhidra+MGGL -MA+MGGL-, 50mg/kg dieta, Snow, *et al.*, 2010). En sus resultados, observaron una drástica diferencia en el perfil de AG de los Erit entre la dieta de aceite de maíz y las dietas de derivados lácteos. Este perfil se vio reflejado en la composición de los Erit, donde, tanto en AM como en AM+MGGL, se observaron menores contenidos en AG n-6 (AA y C22:4).

Como se indicó anteriormente, la disminución en AG n-6 con la suplementación de dietas ricas en AG n-3 ha sido ampliamente reportada. En el estudio desarrollado por Muhlhausler *et al.* (2010) en ratas, se les suministró una dieta enriquecida en AAL gradualmente en diferentes grupos (desde un 0.1% AL hasta el 6.3% de AL sobre los

lípidos totales de la dieta). Además, se les administró AL en todos los grupos, manteniendo el porcentaje en la composición lipídica de cada dieta (16%), a diferencia del AAL. En los resultados que reportaron, mostraron la disminución del contenido de AA y AGPI n-6 totales en LP de eritrocitos a partir de un aporte de 0.8% de AAL sobre los AG totales de la dieta. En esta misma línea, Letondor *et al.*, (2014), también reportaron el incremento de AGPI n-3 y disminución de AGPI n-6 en FC de los Erit de ratas de edad avanzada suplementadas con EPA y DHA, si bien, cabe mencionar que el grupo suplementado, además mostró un incremento en el porcentaje de AL (n-6) respecto al grupo control, aunque en otros el AG n-6 disminuyó su contenido. Otros estudios, como el realizado por Chen *et al.* (2012) observaron que las diferentes modificaciones lipídicas encontradas tanto en Erit y plasma de ratas de una misma especie y edad, eran más dependientes del diferente estado de gestación (no gestantes vs gestantes con 2 días de gestación) que de la suplementación con aceite de pescado en la dieta.

En cuanto al contenido lipídico plasmático total por grupos, se encontraron valores significativamente superiores para el total de AG monoinsaturados en el Grupo C, debido principalmente al aumento del ácido oleico (AO) que se corresponde con el mayoritario en la dieta control rica en aceite de oliva (Figura 5.13.).

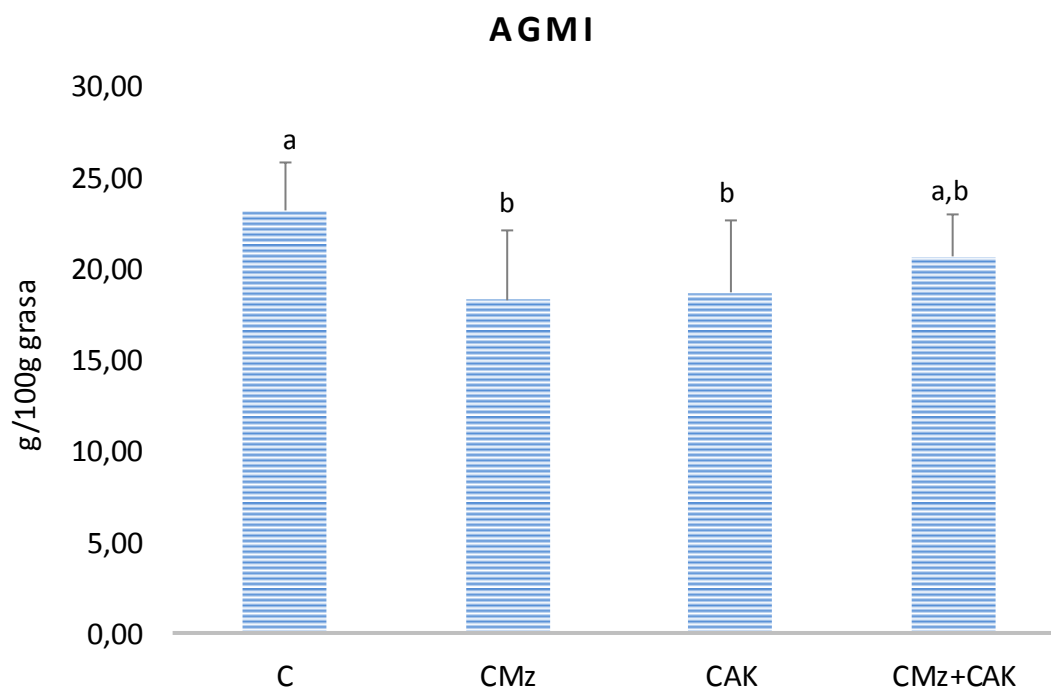


Figura 5.13. Contenido en ácidos grasos monoinsaturados de eritrocitos de los grupos suplementados (g/100g grasa). Grupo Control, CMz: Grupo concentrado de mazada, CAK: Grupo concentrado de aceite de krill. Letras diferentes marcan diferencias significativas entre los grupos suplementados ($p < 0.05$).

➤ Plasma

Entre los EMAG determinados, los mayoritarios del perfil lipídico del plasma fueron el C16:0 y C18:2 n-6 (AL) con, aproximadamente, un 25% cada uno, sobre el total de AG, seguidos del 18:1 n-9 (AO) y C20:4 n-6 (AA) con, aproximadamente, un 13% cada uno. Por otro lado, se observó un mayor contenido en los AG de la serie n-6 C18:3 (gamma-linolénico) y AA en el perfil del Grupo C respecto a los otros grupos suplementados ($p<0.05$).

Tabla 5.12b. Distribución de ésteres metílicos de ácidos grasos (EMAG) de plasma y eritrocitos de los grupos estudiados.

%EMAG	Plasma							
	Grupos suplementados							
	C		CMz		CAK		CMz+CAK	
	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE
C14	0,95 ±	0,29	0,89 ±	0,21	1,15 ±	0,51	0,87 ±	0,23
C15	0,40 ±	0,10	0,45 ±	0,14	0,40 ±	0,17	0,47 ±	0,15
C16	23,21 ±	4,55	28,83 ±	8,16	28,48 ±	6,54	28,10 ±	9,61
C16:1	4,90 ±	1,50	4,82 ±	2,70	4,38 ±	1,14	4,36 ±	2,18
C18	5,99 ±	1,21	7,98 ±	2,85	8,04 ±	2,53	7,91 ±	3,35
C18:1c9	12,25 ±	2,01	12,53 ±	2,03	12,85 ±	2,86	13,00 ±	3,03
C18:1c11	4,21 ±	0,73	4,51 ±	1,20	3,98 ±	0,80	4,66 ±	1,01
C18:2 n6	29,04 ±	4,90	27,39 ±	8,60	26,23 ±	6,57	27,92 ±	7,64
C18:3 n6	0,27 ±	0,15 a	0,16 ±	0,07	0,16 ±	0,07	0,14 ±	0,06
C18:3 n3	0,58 ±	0,24	0,51 ±	0,38	0,47 ±	0,26	0,56 ±	0,30
C20:1	0,24 ±	0,23	0,26 ±	0,21	0,11 ±	0,06	0,23 ±	0,13
C20:3 n6	0,39 ±	0,20	0,25 ±	0,12	0,27 ±	0,22	0,19 ±	0,22
C20:4 n6	13,93 ±	6,76 a	8,83 ±	4,10	9,38 ±	5,60	7,59 ±	4,83
C20:5 n3	0,37 ±	0,19 a	0,28 ±	0,11 a	1,09 ±	0,83 b	0,74 ±	0,46
C24	0,49 ±	0,38	0,65 ±	0,35	0,60 ±	0,32	0,48 ±	0,33
C22:5 n3	0,32 ±	0,18	0,28 ±	0,12	0,45 ±	0,38	0,41 ±	0,34
C22:6 n3	1,09 ±	0,75	0,57 ±	0,31	1,09 ±	0,95	0,88 ±	0,86
AGS	31,39 ±	6,35	39,07 ±	10,98	38,79 ±	8,38	38,19 ±	12,93
AGMI	22,30 ±	4,15	22,68 ±	5,40	21,97 ±	3,87	22,93 ±	4,55
AGPI	46,22 ±	10,11	38,04 ±	11,35	39,03 ±	10,78	38,66 ±	12,20
n6	43,57 ±	9,20	36,44 ±	10,63	35,94 ±	9,17	35,82 ±	10,96
n3	1,72 ±	1,20	0,79 ±	0,41	1,48 ±	1,31	1,29 ±	1,18
ΣAGr	0,41 ±	0,10	0,45 ±	0,18	0,39 ±	0,12	0,37 ±	0,07
ΣAGt	0,49 ±	0,13	0,44 ±	0,11	0,48 ±	0,10	0,45 ±	0,05
ΣAGm	0,71 ±	0,14	0,57 ±	0,12	0,53 ±	0,09	0,50 ±	0,07

AGS: ácidos grasos saturados, AGMI: ácidos grasos monoinsaturados, AGPI: ácidos grasos poliinsaturados AGr: ácidos grasos ramificados, AGt: ácidos grasos *trans*, AGm: ácidos grasos minoritarios. C: Grupo Control, CMz: Grupo concentrado de mazada, CAK: Grupo concentrado de aceite de krill. Letras a la derecha de los valores, indican diferencias significativas entre Grupos suplementados ($p<0.05$).

Por otro lado, el contenido en EPA fue significativamente superior en el Grupo CAK respecto a los Grupos C y CMz ($p<0.05$), lo que está relacionado con el aporte de EPA del AK. Este resultado está de acuerdo con los reportados por otros estudios, como el que llevaron a cabo Chhertry *et al* (2016) con pacientes depresivos, donde observaron que la suplementación con aceite de pescado (4g/día durante 6 semanas), tanto en el grupo control como en el grupo experimental, provocó un incremento significativo de EPA y DHA de LP plasmáticos, así como una disminución de AA. Resultados similares fueron obtenidos por Yu-Hong *et al.* (2016) al suplementar a ratas (separadas en machos y hembras), con una dieta rica en EPA y DHA frente a otro grupo con escaso aporte de AGPICL n-3, donde observaron un incremento en los AGPICL n-3 de plasma, especialmente, en los animales hembra y a su vez, una disminución de AA y C18:3 n-6, aunque el AL n-6 no se modificó significativamente. En esta línea, Vigerust *et al.* (2013), mostraron diferencias significativas del perfil de los AG en plasma de ratones alimentados con una dieta rica en aceite de pescado y otra en AK frente a una dieta control de manteca, comprobando de nuevo que en ambas dietas experimentales aumentaba el contenido de los AG n-3 en plasma en, aproximadamente, un 20% y disminuía en AG n-6 en un porcentaje similar. Cabe señalar que el aporte diario calórico en forma de grasa en las 3 dietas fue de ~23%.

Por último, mencionar que los animales suplementados del presente estudio, no mostraron diferencias significativas en el contenido en las lipoproteínas HDL-col y LDL-col ($p<0.05$) (estos datos forman parte de otra Tesis Doctoral que está siendo realizada en un Grupo Investigador de IMDEA-Alimentación, colaborador del presente Proyecto).

4.9. Caracterización de la composición lipídica en las diferentes zonas cerebrales estudiadas

El sistema nervioso, como ya se ha mencionado anteriormente, se trata del segundo órgano en cuanto a su contenido en lípidos, después del tejido adiposo. Esto se debe a que los lípidos son fundamentales para las funciones fisiológicas y en la estructura de las membranas de las células neuronales (Alnaser 2013). En las últimas décadas se han relacionado bajos contenidos de AG n-3 y FL en el sistema nervioso, así como mayores cantidades de AG n-6, con el deterioro cognitivo en edades avanzadas (Lovden *et al.*, 2013). Por tanto, es fundamental mantener un estado nutricional adecuado que sea capaz de aportar compuestos que contribuyen a conservar, o

incluso a mejorar, la actividad cerebral para prevenir o retrasar el deterioro neurodegenerativo (Parletta *et al.*, 2013).

En base a estos antecedentes, a continuación se discuten los resultados obtenidos en el presente estudio con especial atención a la relación entre la suplementación de la dieta con concentrados ricos en LP obtenidos de Mz y AK, y su posible efecto en la composición lipídica de distintas regiones cerebrales (Figura 5.14.).

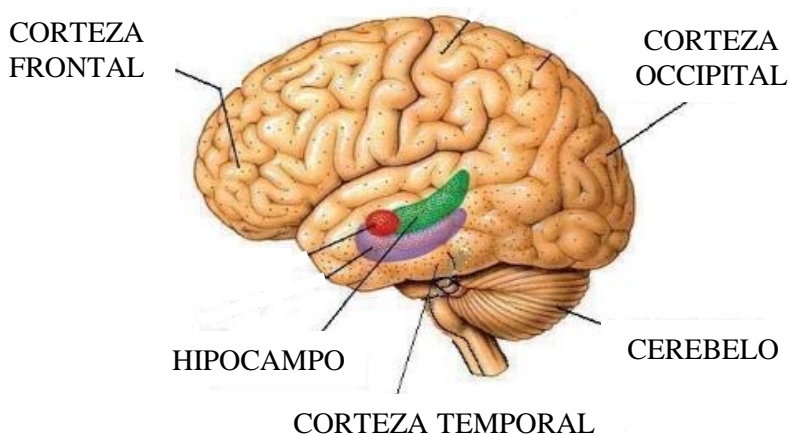


Figura 5.14. Regiones cerebrales estudiadas

4.9.1. Determinación de esfingolípidos de cerebro mediante UPLC-QToF-MS

La determinación de los compuestos no identificados (n.i.) que se muestran en el cromatograma ejemplo de las partes extraídas de cerebro (Figura 5.15.) (HPLC-ELSD), fue llevada a cabo mediante el empleo de UPLC-QToF-MS

En el cromatograma, al minuto 2.21, se observaron dos picos con m/z 453.3421 y m/z 566.4273, con ionización +2 según indicaba la relación 0.5 de los picos M a M+1 y M+1 a M+2 (Figura 5.16.).

Se comprobó que el valor m/z 453.3421 correspondía al ión $[M+NH_4+H]^+2$ del compuesto Lactosyl-Ceramide (d18:1/18:1), según la base de datos LIPIDMAPS (www.lipidmaps.org), compuesto con referencia LMSP0501AB11. Se observó además la presencia de un valor m/z 905.6772, correspondiente a una composición elemental $C_{48}H_{93}N_2O_{13}$, la cual es coincidente con la correspondiente al ión $[M+H]^+$ del mencionado compuesto, y con el valor m/z 453.3421 para el ión $[M+H+NH_4]^+2$. Para

el valor m/z 566.4273 se calculó la masa exacta correspondiente a los iones $[M+2H]^+2$, $[M+NH_4+H]^+2$ y $[M+2NH_4]^+2$, obteniendo para el primero de ellos únicamente correspondencia en la base de datos LipidMaps con el gangliósido NeuAc α 2-3-Gal β -Cer(d18:1/26:0), con composición elemental $C_{61}H_{114}N_2O_{16}$, masa exacta 1130.8168 y referencia en la base indicada LMSP0601AA06. No se encontró ningún compuesto anotado en la mencionada base para los otros dos posibles iones indicados anteriormente.

Determinadas las áreas de los picos de dichos valores m/z en los respectivos cromatogramas extraídos (EICs) y sumando las cantidades correspondientes a las fases orgánica y acuosa, se calculó un contenido de 0.668 μg para LacCer(d18:1/18:1), y de 0.521 μg para el gangliósido, en los mg de grasa inicial (10 mg), ambos medidos con respecto al compuesto estándar indicado.

4.9.2. Composición lipídica de corteza frontal, temporal y occipital de los animales estudiados

Cabe mencionar la importancia del estudio de los lóbulos cerebrales frontal, temporal y occipital debido a su estrecha relación con el desarrollo y mantenimiento de las funciones cognitivas. La corteza frontal (CF), se caracteriza por su implicación en las funciones motoras, además de estar implicada en numerosos procesos cognitivos como son las funciones de ejecución, atención y memoria (Chayer y Freedman, 2001), además de otras funciones relacionadas con los comportamientos conductuales. La corteza temporal (CT) está involucrada en funciones y procesos de retención de memoria visual, memoria a largo plazo y espacial, y asociaciones emocionales, entre otras. (Smith y Kosslyn, 2007). En cuanto a las funciones más representativas de la corteza occipital (CO), destaca el reconocimiento de imágenes y procesamiento espacial, ya que se trata de la parte cerebral donde se lleva a cabo la percepción del sistema visual (Werth, 2006).

En base a estos antecedentes, se consideró del mayor interés llevar a cabo el estudio de la composición lipídica de estas regiones cerebrales, así como de hipocampo (HP) y cerebelo (CB), que serán descritos posteriormente.

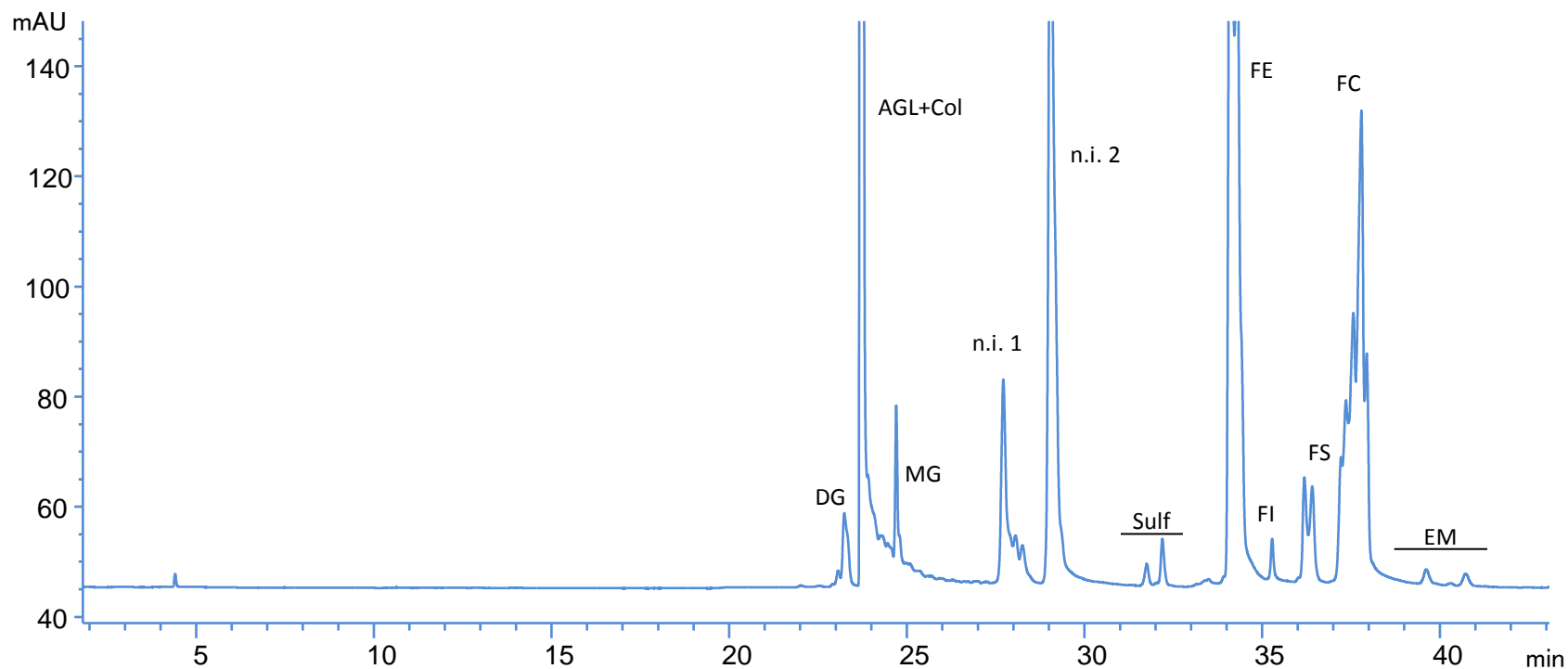


Figura 5.15. Cromatograma de cerebelo (ejemplo de clases lipídicas de las regiones cerebrales del presente estudio) HPLC-ELSD. DG: diglicéridos, AGL+Col: ácidos grasos libres+ colesterol, n.i.: no identificado, Sulf: sulfatidas, FE: fosfatidiletanolamina, FI: fosfatidilinositol, FS: fosfatidilserina, FC: fosfatidilcolina, EM: esfingomielina.

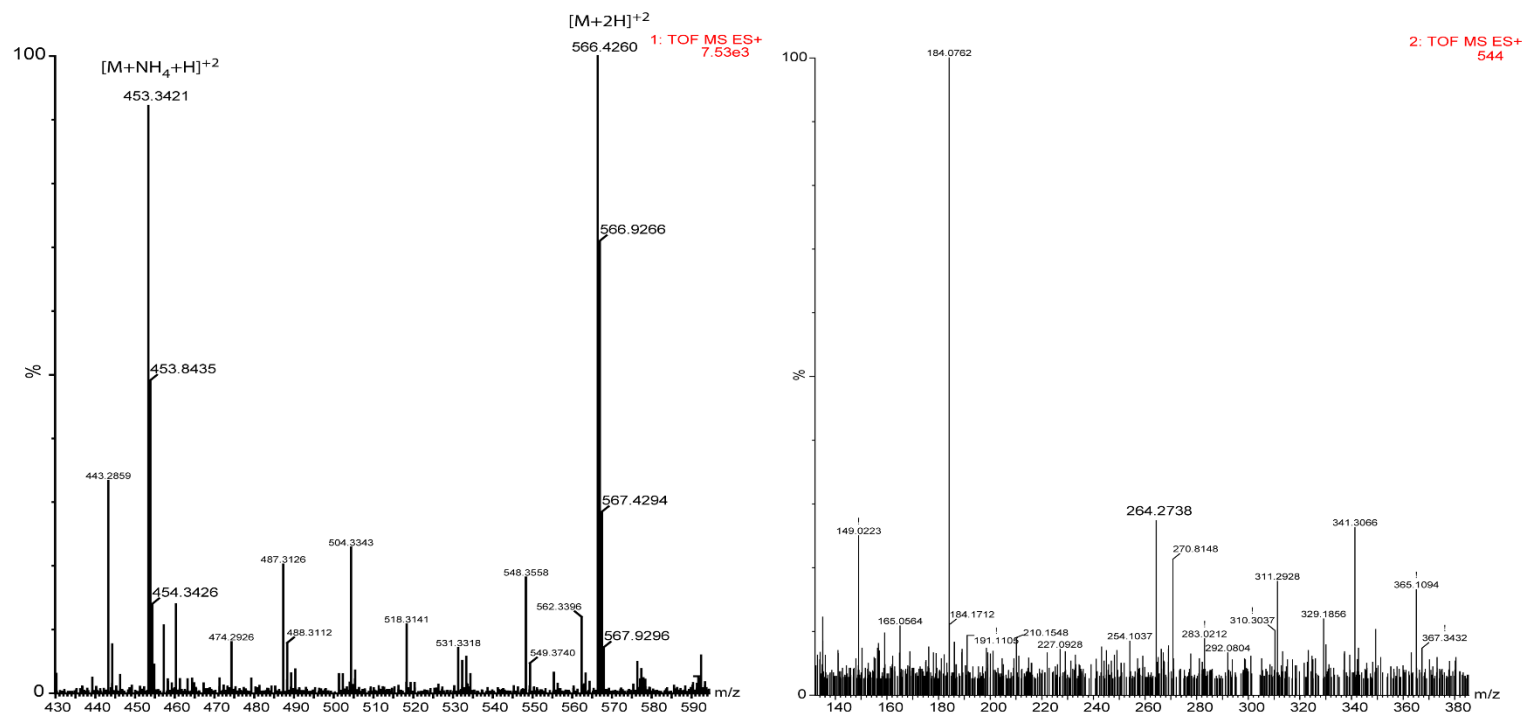


Figura 5.16. Espectro de masas para los compuestos no identificados m/z 453.3421 y m/z 566.4273 (n.i.1 y n.i.2, respectivamente). Espectros de masas correspondientes a la función 1 (panel izquierdo) y a la función 2 (panel derecho), para los valores m/z 453.3421 y 566.4260, y el característico fragmento de las ceramidas bajo ionización en positivo de m/z 264.2738. En el panel izquierdo (función 1, full-scan) puede observarse la relación 0.5 entre los picos M y M+1, así como entre los picos M+1 y M+2 para los valores m/z mencionados, siendo este hecho indicativo de la ionización con carga +2.

Composición en clases lipídicas (HPLC-ELSD)

La composición en CL de CF, CT y CO se describe en la Tabla 5.13a., 5.13b. y 5.13c.

En los tres lóbulos, la fracción de AGL+Col fue la CL predominante debido a la importante presencia de Col en las membranas celulares y en la composición cerebral. FE y FC fueron los LP mayoritarios con un contenido similar de aproximadamente 20-25% sobre el total de grasa. Recientemente, Dawson *et al.* (2015) publicaron una amplia revisión sobre FL y SL en cerebro en relación con su heterogeneidad y posibles afecciones patológicas, técnicas de extracción, y técnicas de caracterización basadas en la espectrometría de masas. Entre otros datos, reportaron concentraciones de FE, FC y FS similares a las proporciones observadas en el presente estudio, con aproximadamente 45% FE, 45% FC y 7% FS, sobre el total de LP. Little *et al.*, (2007), también reportaron una composición de corteza cerebral en ratas Wistar similar a la obtenida en el presente estudio en FC, FE y Col con valores aproximados de 20%, 21%, y 38% respectivamente. En el mismo estudio, investigaron el efecto de la suplementación de 10mg de DHA en la dieta tanto de ratas jóvenes como de edad avanzada, sin observar diferencias en la distribución de las CL de la corteza cerebral. En general, la distribución de las CL fue similar en los tres lóbulos, sin embargo, se mostró un mayor contenido de ceramidas (Cer) y gangliósidos en CT y CO que en CF (~2% y ~9% en CT y CO y ~1% y ~5% en CF). En cuanto al contenido de FS, se mostró un menor contenido en el Grupo CMz respecto al Grupo CMz+CAK ($p<0.05$) (Figura 5.17.) para la CT. Respecto a este comportamiento, aunque cabría esperar que fuera superior en las dietas suplementadas con Mz (por su mayor contenido en FS), existen estudios previos donde observaron un incremento de FS en células neuronales con una suplementación de DHA (Kim *et al* 2010). Este incremento fue superior cuando la suplementación de DHA iba acompañada con la suplementación de serina, lo que estaría de acuerdo con los datos observados en este estudio para el grupo CMz+CAK. Además, reportaron que una suplementación con AO (AG mayoritario del Grupo C del presente estudio), no tendría efectos de incremento/disminución de los niveles de FS en células neuronales, así como la suplementación directa de FS, siendo más relevante el efecto de la ingesta de DHA que del propio FL.

Por otro lado, también en CT, se observó un incremento significativo de gangliósidos en los Grupos CAK y CMz+CAK respecto al Grupo C (Figura 5.18.). El contenido en gangliósidos de la CO, también se vio afectado por la dieta de los animales, al igual que en CT, donde se incrementó su contenido en los animales suplementados con

CAPÍTULO V

CMz+CAK respecto al contenido de gangliósidos observado en los Grupos C y CMz (Figura 5.18.).

Tabla 5.13a. Distribución de clases lipídicas de corteza frontal (g/100grasa).

% CLASE LIPÍDICA	Corteza frontal							
	Grupos suplementados							
	C		CMz		CAK		CMz+CAK	
	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE
DG	0,40 ±	0,26	0,27 ±	0,13	0,43 ±	0,11	0,44 ±	0,15
AGL+Col	38,84 ±	8,28	35,24 ±	7,47	34,94 ±	7,65	36,18 ±	9,80
MG	0,83 ±	0,29	1,14 ±	1,01	1,08 ±	0,79	2,10 ±	2,43
Cer	1,24 ±	0,50	1,18 ±	0,23	1,29 ±	0,56	1,19 ±	0,60
Gangliósidos	4,37 ±	3,86	5,17 ±	3,64	6,09 ±	4,41	6,66 ±	4,67
Sulf	0,64 ±	0,35	0,65 ±	0,51	0,65 ±	0,34	1,05 ±	0,55
AF	<0,2	-	<0,2	-	<0,2	-	<0,2	-
FE	23,00 ±	5,26	22,86 ±	6,64	24,25 ±	6,84	19,32 ±	11,88
FI	0,84 ±	0,63	1,13 ±	1,08	0,69 ±	0,34	0,82 ±	0,49
FS	3,62 ±	0,91	3,12 ±	1,54	3,07 ±	1,82	3,28 ±	1,39
FC	24,41 ±	7,41	27,92 ±	7,94	26,31 ±	4,22	27,52 ±	4,93
EM	1,29 ±	0,37	1,14 ±	0,54	1,09 ±	0,55	1,22 ±	0,38
Σ LP	53,16 ±	9,71	56,06 ±	10,12	55,34 ±	11,20	52,16 ±	14,84

Cer: ceramidas, Sulf: sulfatidas, AF: ácido fosfatídico. Letras diferentes a la derecha, marcan diferencias significativas entre los grupos suplementados ($p<0.05$).

Tabla 5.13b. Distribución de clases lipídicas de corteza temporal (g/100grasa).

% CLASE LIPÍDICA	Corteza temporal							
	Grupos suplementados							
	C		CMz		CAK		CMz+CAK	
	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE
DG	0,38 ±	0,17	0,32 ±	0,08	0,26 ±	0,16	0,39 ±	0,21
AGL+Col	36,01 ±	13,21	35,50 ±	7,78	31,07 ±	8,18	33,80 ±	7,54
MG	0,71 ±	0,25	1,09 ±	0,76	1,11 ±	0,91	1,65 ±	1,31
Cer	2,34 ±	0,75	1,79 ±	0,42	1,88 ±	0,74	1,93 ±	0,87
Gangliósidos	8,99 ±	1,21 a	8,40 ±	1,02	10,19 ±	0,66 b	10,90 ±	1,84 b
Sulf	0,79 ±	0,36	0,61 ±	0,50	0,55 ±	0,36	1,07 ±	0,59
AF	<0,2	-	<0,2	-	<0,2	-	<0,2	-
FE	24,18 ±	5,99	24,49 ±	4,84	26,05 ±	4,93	22,21 ±	8,11
FI	0,59 ±	0,34	0,85 ±	0,94	0,62 ±	0,31	0,65 ±	0,34
FS	3,48 ±	1,06 a	1,98 ±	1,52 b	3,26 ±	1,02	3,49 ±	1,42 a
FC	21,32 ±	5,75	24,38 ±	5,88	23,62 ±	3,49	22,61 ±	3,53
EM	0,99 ±	0,47	1,03 ±	0,44	1,04 ±	0,33	0,97 ±	0,20
Σ LP	50,57 ±	13,17	52,47 ±	7,47	54,59 ±	8,17	49,92 ±	9,42

Cer: ceramidas, Sulf: sulfatidas, AF: ácido fosfatídico. Letras diferentes a la derecha, marcan diferencias significativas entre los grupos suplementados ($p<0.05$).

Tabla 5.13c. Distribución de clases lipídicas de corteza occipital (g/100grasa).

% CLASE LIPÍDICA	Corteza occipital							
	Grupos suplementados							
	C		CMz		CAK		CMz+CAK	
	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE
DG	0,47 ±	0,19	0,36 ±	0,11	0,36 ±	0,10	0,42 ±	0,11
AGL+Col	37,67 ±	11,88	36,05 ±	7,66	33,04 ±	8,17	34,47 ±	8,69
MG	0,94 ±	0,38	1,28 ±	0,96	1,04 ±	0,82	1,52 ±	1,01
Cer	2,68 ±	1,03	1,88 ±	0,37	1,91 ±	0,87	1,87 ±	0,83
Gangliósidos	9,24 ±	1,18 a	8,88 ±	1,61 a	10,02 ±	1,47	11,07 ±	1,34 b
Sulf	0,77 ±	0,28	0,69 ±	0,68	0,64 ±	0,38	1,22 ±	0,83
AF	<0,2	-	<0,2	-	<0,2	-	<0,2	-
FE	22,39 ±	6,96	23,57 ±	4,01	24,61 ±	5,89	20,43 ±	7,41
FI	0,65 ±	0,41	0,77 ±	0,68	0,52 ±	0,20	0,74 ±	0,32
FS	3,50 ±	1,06	2,92 ±	1,82	3,26 ±	1,12	3,69 ±	1,16
FC	20,36 ±	5,83	22,90 ±	6,54	23,31 ±	3,48	23,28 ±	4,59
EM	0,93 ±	0,47	0,97 ±	0,37	0,91 ±	0,25	0,99 ±	0,34
Σ LP	47,84 ±	12,81	51,13 ±	8,58	52,62 ±	8,42	49,12 ±	9,47

Cer: ceramidas, Sulf: sulfatidas, AF: ácido fosfatídico. Letras diferentes a la derecha, marcan diferencias significativas entre los grupos suplementados ($p<0.05$).

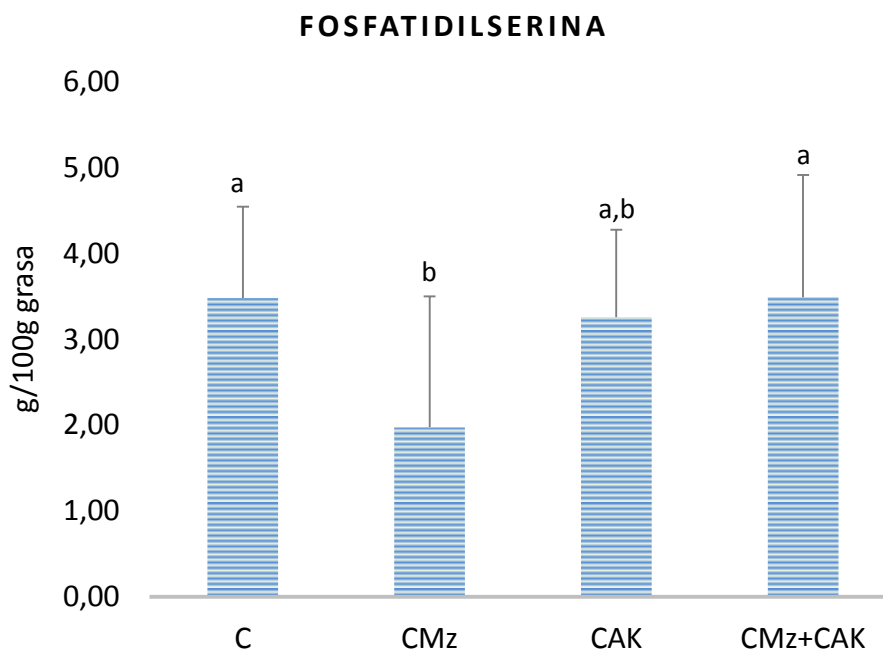


Figura 5.17. Contenido en fosfatidilserina de corteza temporal de los grupos suplementados (g/100g grasa). C: Grupo Control, CMz: Grupo concentrado de mazada, CAK: Grupo concentrado de aceite de krill. Letras diferentes marcan diferencias significativas entre los grupos suplementados ($p<0.05$).

Los gangliósidos son glucolípidos que se caracterizan por presentar en su estructura una o más unidades de ácido siálico unida a la parte glucídica de la molécula. Por el hecho de encontrarse en elevadas concentraciones en las células del sistema

nervioso, los gangliósidos se han considerado como moléculas que juegan un papel de importancia en la actividad neuronal, aunque hoy es sabido que además actúan como moléculas de reconocimiento celular y como reguladores de las interacciones sinápticas cerebrales (Schaar, 2014). Por otro lado, cabe mencionar que en numerosas investigaciones realizadas en cultivos celulares, ha sido reportado un efecto de expansión de las neuronas, así como una mayor supervivencia frente a moléculas tóxicas al incrementar de manera externa el contenido de gangliósidos (Camand *et al.*, 2004; Rogers *et al.*, 1986).

Aunque los mecanismos moleculares no son del todo conocidos, ha sido posible comprobar que la suplementación de la dieta de los animales con concentrados en LP del Grupo CMz+CAK provoca un incremento significativo de los niveles de gangliósidos tanto en los tejidos de CT y CO.

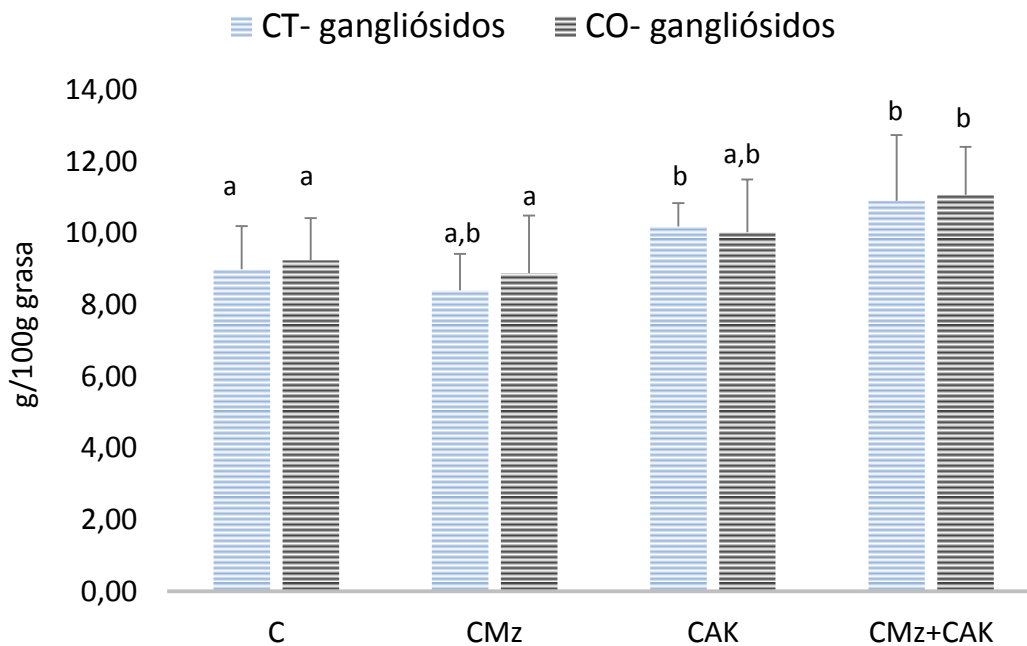


Figura 5.18. Contenido en gangliósidos de las cortezas temporal y occipital de los grupos suplementados. C: Grupo Control, CMz: Grupo concentrado de mazada, CAK: Grupo concentrado de aceite de krill. Letras diferentes marcan diferencias significativas entre los grupos suplementados para cada tejido ($p < 0.05$).

Composición en ésteres metílicos de ácidos grasos (CG-MS)

La composición en EMAG de CF, CT y CO se detalla en la Tabla 5.14a., 5.14b., y 5.14c. respectivamente.

Tabla 5.14a. Distribución en ésteres metílicos de ácidos grasos (EMAG) de corteza frontal de las ratas suplementadas con las distintas dietas estudiadas

% EMAG	Corteza frontal							
	Grupos suplementados							
	C		CMz		CAK		CMz+CAK	
	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE
C14	0,28	± 0,23	0,27	± 0,17	0,38	± 0,41	0,25	± 0,14
DMA16	2,32	± 0,56 a	1,95	± 0,26	1,76	± 0,56	1,46	± 0,61 b
C16	25,91	± 3,50	29,76	± 3,44	27,24	± 4,35	28,50	± 6,54
C16:1	0,42	± 0,16	0,50	± 0,27	0,51	± 0,29	0,97	± 1,68
DMA18	3,96	± 0,81 a	3,47	± 0,53	3,08	± 1,10	2,73	± 1,33 b
C18i	1,21	± 0,53 a	0,80	± 0,21	0,84	± 0,27	0,66	± 0,50 b
C17:1	1,62	± 0,63 a	1,12	± 0,30	1,19	± 0,43	0,95	± 0,63 b
C18	20,73	± 2,79	22,31	± 2,74	21,14	± 3,73	23,13	± 6,62
C18:1c9	18,40	± 2,23	19,28	± 1,22	19,79	± 2,80	20,69	± 3,31
C18:1c11	3,42	± 0,43 a	3,83	± 0,36	3,64	± 0,61	4,19	± 0,99 b
C18:2 n6	0,51	± 0,16	0,75	± 0,82	1,06	± 1,38	1,97	± 5,26
C18:3 n3	1,44	± 0,58	1,03	± 0,24	1,36	± 0,34	1,29	± 0,35
C20:1	0,30	± 0,06	0,21	± 0,08	0,29	± 0,14	0,31	± 0,14
C20:3 n6	0,24	± 0,12	0,14	± 0,05	0,21	± 0,12	0,20	± 0,09
C20:4 n6	8,20	± 2,74	6,88	± 2,46	7,74	± 3,67	5,31	± 5,20
C24	0,35	± 0,54	0,20	± 0,07	0,23	± 0,10	0,22	± 0,07
C22:6 n3	8,54	± 3,69	5,75	± 2,45	7,56	± 5,37	5,54	± 6,29
AGS	54,28	± 4,98	57,97	± 4,81	53,78	± 6,56	56,32	± 11,65
AGMI	24,07	± 2,50	24,90	± 1,22	25,42	± 3,21	27,10	± 4,62
AGPI	21,09	± 6,74	16,33	± 5,60	19,96	± 9,44	15,92	± 13,32
Σn6	8,91	± 2,68	7,76	± 2,59	9,01	± 3,57	7,48	± 7,42
Σn3	10,02	± 3,81	6,79	± 2,53	9,01	± 5,32	6,90	± 6,27
ΣDMA	6,29	± 1,30 a	5,43	± 0,75	4,84	± 1,64	4,20	± 1,90 b
ΣAGr	0,10	± 0,06	0,03	± 0,02	0,04	± 0,03	0,05	± 0,05
ΣAGm	0,09	± 0,05	0,10	± 0,08	0,08	± 0,04	0,22	± 0,20
Σn.i.	2,28	± 0,89	1,72	± 0,64	1,90	± 0,79	1,33	± 1,22

DMA: dimetilacetales, AGS: ácidos grasos saturados, AGMI: ácidos grasos monoinsaturados, AGPI: ácidos grasos poliinsaturados AGr: ácidos grasos ramificados, AGm: ácidos grasos minoritarios. n.i.: no identificados, C: Grupo Control, CMz: Grupo concentrado de mazada, CAK: Grupo concentrado de aceite de krill. Letras a la derecha de los valores, indican diferencias significativas entre Grupos suplementados ($p < 0.05$).

Tabla 5.14b. Distribución en ésteres metílicos de ácidos grasos (EMAG) de corteza temporal de las ratas suplementadas con las distintas dietas estudiadas.

% EMAG	Corteza temporal							
	Grupos suplementados							
	C		CMz		CAK		CMz+CAK	
	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE
C14	0,27 ± 0,19		0,19 ± 0,15		0,16 ± 0,06		0,17 ± 0,08	
DMA16	2,45 ± 0,25		2,37 ± 0,42		2,31 ± 0,25		2,14 ± 0,47	
C16	23,44 ± 2,72		27,00 ± 4,60		24,39 ± 2,66		22,27 ± 8,52	
C16:1	0,42 ± 0,13		0,38 ± 0,06		0,41 ± 0,11		0,75 ± 0,86	
DMA18	4,11 ± 0,52		3,96 ± 0,57		3,86 ± 0,44		3,26 ± 0,72	
C18i	1,50 ± 0,44 a		1,21 ± 0,23		1,13 ± 0,47		0,93 ± 0,63 b	
C17:1	2,09 ± 0,53		1,65 ± 0,47		1,81 ± 0,39		1,55 ± 0,65	
C18	18,11 ± 2,00		19,33 ± 2,73		19,10 ± 2,58		21,48 ± 7,65	
C18:1c9	17,61 ± 1,71 a		18,89 ± 1,52		19,11 ± 1,97		21,68 ± 5,39 b	
C18:1c11	3,35 ± 0,46		3,66 ± 0,34		3,54 ± 0,45		4,31 ± 1,37	
C18:2 n6	0,60 ± 0,20		0,48 ± 0,11		0,64 ± 0,16		1,49 ± 3,22	
C18:3 n3	1,41 ± 0,43		1,34 ± 0,38		1,60 ± 0,32		1,90 ± 0,83	
C20:1	0,41 ± 0,22		0,27 ± 0,11		0,30 ± 0,09		0,45 ± 0,26	
C20:3 n6	0,16 ± 0,05 a		0,15 ± 0,08 b		0,17 ± 0,07 b		0,27 ± 0,09	
C20:4 n6	10,71 ± 2,52		8,70 ± 2,46		9,33 ± 2,70		7,76 ± 4,64	
C24	0,26 ± 0,06		0,23 ± 0,08		0,24 ± 0,07		0,39 ± 0,41	
C22:6 n3	10,01 ± 2,64		8,16 ± 3,53		9,73 ± 3,56		7,42 ± 4,85	
AGS	50,52 ± 4,33		54,23 ± 5,72		51,11 ± 4,56		50,86 ± 7,00	
AGMI	23,92 ± 2,18 a		24,83 ± 1,58		25,17 ± 2,61		28,70 ± 6,75 b	
AGPI	25,66 ± 5,93		20,94 ± 6,79		23,72 ± 6,78		20,44 ± 10,26	
Σn6	11,60 ± 2,47		9,33 ± 2,53		10,13 ± 2,63		9,49 ± 5,73	
Σn3	11,69 ± 3,04		9,62 ± 3,76		11,44 ± 3,61		9,41 ± 4,44	
ΣDMA	6,73 ± 0,78 a		6,11 ± 1,25		5,91 ± 0,83		5,42 ± 1,15 b	
ΣAGr	0,09 ± 0,09		0,05 ± 0,04		0,03 ± 0,02		0,03 ± 0,03	
ΣAGm	0,22 ± 0,05		0,18 ± 0,03		0,19 ± 0,04		0,22 ± 0,08	
Σn.i.	2,51 ± 0,68		1,98 ± 0,57		2,12 ± 0,62		1,64 ± 0,97	

DMA: dimetilacetales, AGS: ácidos grasos saturados, AGMI: ácidos grasos monoinsaturados, AGPI: ácidos grasos poliinsaturados, AGr: ácidos grasos ramificados, AGm: ácidos grasos minoritarios. n.i.: no identificados, C: Grupo Control, CMz: Grupo concentrado de mazada, CAK: Grupo concentrado de aceite de krill. Letras a la derecha de los valores, indican diferencias significativas entre Grupos suplementados ($p < 0.05$).

La distribución del perfil de AG de los tres lóbulos en los grupos de animales estudiados, en general, puede considerarse que presentan un contenido similar entre ellos. Los AG mayoritarios, fueron C16, C18, C18:1, AA y DHA (Tabla 5.13a, 5.13b. y 5.13c.). Esta distribución está de acuerdo con los datos reportados por Rahman *et al.*, (2010) en diferentes partes de cerebro de ratones. La suplementación de las diferentes dietas experimentales y, en especial, la que contiene AK (con EPA y DHA) no supuso un incremento de estos AG ni la disminución significativa de AA observada en otros tejidos. Este hecho resulta bastante contradictorio en la bibliografía, debido a la

diferencia entre los resultados obtenidos por otros autores. Chen *et al.* (2012) tampoco encontraron cambios significativos en la concentración de EPA, DHA, AA, ni de C22:4 n-6 en diferentes regiones de cerebro, como CF e HP tras la suplementación con aceite de pescado a la dieta de ratas. Sin embargo, en otras investigaciones como la que llevaron a cabo Di Marzo *et al.* (2010) observaron un incremento de EPA en cerebro de ratas de edad avanzada (18 meses) con la suplementación de aceite de pescado y AK. Si bien, este incremento no se observó en el contenido de DHA respecto al grupo control para la dieta suplementada con aceite de pescado, pero sí en los animales suplementados con AK (con el mismo contenido en AGPI n-6 y n-3). Además, en el estudio citado se reporta que tampoco encontraron diferencias en la composición de AA de cerebro entre los animales que consumieron las diferentes dietas.

Por otro lado, en el presente estudio se observó un menor contenido en dimetilacetales -DMA- (de C18 y C16) en los animales del Grupo CMz+CAK respecto al contenido observado en las cortezas cerebrales del Grupo C (~4.5% y ~6.5% DMA total, respectivamente) ($p < 0.05$). Los DMA se diferencian de los EMAG por ser los productos de derivatización de AG unidos mediante enlace éter a la molécula de glicerol en lugar de estar unidos a ésta mediante enlace éster, como es el caso de FL, o glicéridos. En esta línea, los compuestos lipídicos en cuya estructura existe la unión del AG en posición *sn1* con la molécula de glicerol mediante enlace éter, se trata de los plasmalógenos (Pons *et al.*, 2000). Los plasmalógenos, son similares molecularmente a los FL. Así, la FE se diferencia de la plasmanil-etanolamina en los enlaces que unen a los dos AG con el glicerol en cada molécula (Nagan *et al.*, 2001).

Los plasmalógenos han sido descritos como componentes estructurales de las membranas celulares, encontrándose en importantes cantidades en tejido nervioso (aproximadamente el 7% de los LP). Además, se le atribuyen otro tipo de funciones entre las que se proponen como un reservorio de AGPI para mantener niveles elevados de estos AG en determinados tejidos, al ser acumulados preferencialmente en la estructura de los plasmalógenos (Nagan y Zoeller, 2001). En este punto, cabe mencionar la existencia de numerosos estudios que vinculan niveles bajos de plasmalógenos en cerebro en pacientes con enfermedades neurodegenerativas (Hiratsuka *et al.*, 2008), si bien, el menor nivel de plasmalógenos se encuentra relacionado con un menor nivel de DHA en estos pacientes (Nagan y Zoeller, 2001).

CAPÍTULO V

Tabla 5.14c. Distribución en ésteres metílicos de ácidos grasos (EMAG) de corteza occipital de las ratas suplementadas con las distintas dietas estudiadas.

% EMAG	Corteza occipital							
	Grupos suplementados							
	C		CMz		CAK		CMz+CAK	
	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE
C14	0,25 ± 0,13		0,16 ± 0,05		0,21 ± 0,13		0,29 ± 0,36	
DMA16	2,23 ± 0,25 a		2,13 ± 0,40		1,75 ± 0,27 b		1,72 ± 0,53 b	
C16	22,64 ± 3,00		25,41 ± 3,94		24,07 ± 5,03		25,86 ± 5,46	
C16:1	0,42 ± 0,12		0,40 ± 0,08		0,40 ± 0,08		0,49 ± 0,13	
DMA18	4,17 ± 0,47 a		4,05 ± 0,37 a		3,49 ± 0,58		3,19 ± 1,07 b	
C18i	1,28 ± 0,17		1,26 ± 0,25		1,13 ± 0,26		1,08 ± 0,45	
C17:1	2,03 ± 0,42		1,68 ± 0,36		1,49 ± 0,37		1,38 ± 0,66	
C18	19,09 ± 2,45		20,04 ± 2,66		20,18 ± 3,98		22,28 ± 4,58	
C18:1c9	19,22 ± 1,93		19,78 ± 1,60		20,05 ± 3,01		21,79 ± 3,22	
C18:1c11	3,45 ± 0,35		3,69 ± 0,35		3,44 ± 0,58		3,86 ± 0,75	
C18:2 n6	0,61 ± 0,23		0,62 ± 0,21		0,60 ± 0,12		0,55 ± 0,29	
C18:3 n3	1,43 ± 0,36		1,30 ± 0,39		1,48 ± 0,35		1,64 ± 0,33	
C20:1	0,39 ± 0,21		0,25 ± 0,10		0,28 ± 0,07		0,33 ± 0,14	
C20:3 n6	0,34 ± 0,27		0,19 ± 0,09		0,20 ± 0,08		0,27 ± 0,14	
C20:4 n6	9,76 ± 2,78		8,58 ± 1,95		7,91 ± 2,74		6,64 ± 4,95	
C24	0,33 ± 0,11		0,29 ± 0,10		0,31 ± 0,10		0,33 ± 0,09	
C22:6 n3	9,55 ± 3,42		7,95 ± 2,26		10,98 ± 8,11		7,22 ± 5,28	
AGS	50,50 ± 5,20		53,50 ± 4,75		51,29 ± 8,25		54,92 ± 8,05	
AGMI	25,48 ± 1,93		25,81 ± 1,68		25,66 ± 3,66		27,81 ± 3,69	
AGPI	24,01 ± 7,00		20,69 ± 5,02		23,06 ± 11,20		17,27 ± 11,54	
Σn6	10,68 ± 2,84		9,39 ± 2,02		8,70 ± 2,64		7,47 ± 5,20	
Σn3	11,08 ± 3,55		9,31 ± 2,48		12,53 ± 8,12		8,33 ± 5,37	
ΣDMA	6,41 ± 0,69 a		6,18 ± 0,74		5,24 ± 0,80		4,91 ± 1,58 b	
ΣAGr	1,34 ± 0,17		1,29 ± 0,25		1,15 ± 0,26		1,12 ± 0,45	
ΣAGm	0,31 ± 0,10		0,20 ± 0,06		0,30 ± 0,07		0,20 ± 0,03	
Σn.i.	2,19 ± 0,70		1,97 ± 0,59		1,78 ± 0,55		1,45 ± 1,06	

DMA: dimetilacetales, AGS: ácidos grasos saturados, AGMI: ácidos grasos monoinsaturados, AGPI: ácidos grasos poliinsaturados AGR: ácidos grasos ramificados, AGm: ácidos grasos minoritarios. n.i.: no identificados, C: Grupo Control, CMz: Grupo concentrado de mazada, CAK: Grupo concentrado de aceite de krill. Letras a la derecha de los valores, indican diferencias significativas entre Grupos suplementados ($p<0.05$).

En el presente estudio, aunque se mostraron contenidos significativamente menores de DMA en CF, CT y CO del Grupo CMz+CAK respecto al Grupo C (Figura 5.19.) ($p<0.05$), sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en el contenido total de AGPI, ni de DHA, entre los distintos grupos de animales suplementados con lípidos ricos en LP.

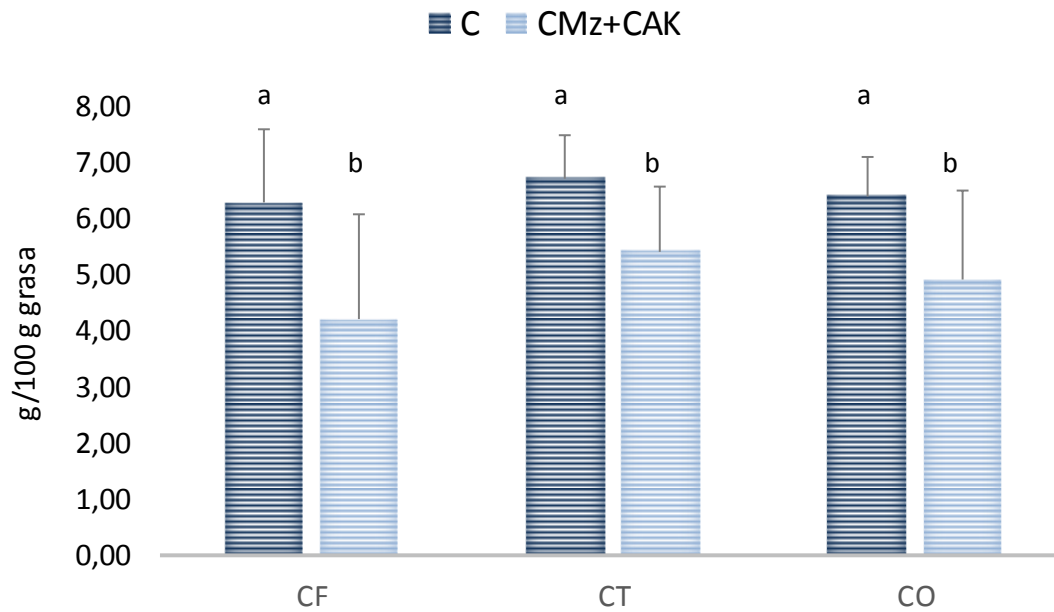


Figura 5.19. Contenido en DMA totales en corteza frontal, temporal y occipital de los grupos suplementados. C: Grupo Control, CMz: Grupo concentrado de mazada, CAK: Grupo concentrado de aceite de krill. Letras diferentes marcan diferencias significativas entre los grupos suplementados para cada tejido ($p < 0.05$).

4.9.3. Caracterización de la composición lipídica del hipocampo de los animales estudiados

El hipocampo (HP) se encuentra en la parte medial del lóbulo temporal (CT) y juega un papel fundamental en la memoria a largo plazo. Si bien se ha reportado la vinculación entre los daños que afectan al HP con pérdida de memoria, parece estar más relacionada con dificultades en la formación de nuevos recuerdos (memoria a corto plazo), pudiendo mantener intacta la memoria a largo plazo (Squire y Schacter, 2002), ya que su función en la memoria se asocia principalmente a la detección y adquisición de estímulos novedosos (VanElzakker *et al.*, 2008). Por otro lado, han sido numerosos estudios en animales que han vinculado la función del HP con la memoria espacial, y la capacidad de crear un esquema espacial del entorno (Solstad *et al.*, 2008).

Igualmente, parece existir una estrecha relación entre la función cognitiva, la modulación de la neurogénesis en el HP adulto y determinados lípidos de la dieta (Innis, 2007), que hacen interesante la investigación en la composición lipídica del HP en relación con la dieta aportada a los animales del presente estudio.

Composición en clases lipídicas (HPLC-ELSD)

La composición en CL del HP de los animales suplementados, se detalla en la Tabla 5.15.

Tabla 5.15. Composición en clases lipídicas del HP de las ratas suplementadas (g/100g grasa).

% CLASE LIPÍDICA	Hipocampo							
	Grupos suplementados							
	C		CMz		CAK		CMz+CAK	
	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE
DG	0,47 ±	0,26	0,51 ±	0,50	0,39 ±	0,12	3,86 ±	9,62
AGL+Col	37,41 ±	9,84	35,10 ±	6,58	32,91 ±	8,54	34,45 ±	9,31
MG	1,08 ±	1,04	1,46 ±	1,24	1,15 ±	0,66	1,59 ±	1,06
Cer	1,66 ±	1,16 a	0,82 ±	0,37	0,90 ±	0,37	0,69 ±	0,28 b
Gangliósidos	6,25 ±	1,25	7,79 ±	3,18	6,84 ±	1,28	6,99 ±	1,95
Sulf	0,64 ±	0,32	0,66 ±	0,42	0,45 ±	0,27	0,85 ±	0,51
AF	0,80 ±	0,93	1,14 ±	0,63	0,44 ±	0,32	0,60 ±	0,25
FE	20,69 ±	6,99	19,07 ±	7,82	22,89 ±	6,75	17,70 ±	9,90
FI	1,04 ±	1,10	1,26 ±	0,92	0,79 ±	0,57	1,08 ±	0,68
FS	4,16 ±	0,98	3,66 ±	2,40	3,31 ±	1,48	4,04 ±	1,02
FC	24,61 ±	6,76	28,00 ±	7,23	28,84 ±	3,63	28,09 ±	4,59
EM	1,43 ±	1,03	1,53 ±	0,65	1,28 ±	0,36	1,36 ±	0,54
Σ LP	51,93 ±	9,37	53,39 ±	9,06	57,12 ±	8,95	52,27 ±	12,47

Grupo Control, CMz: Grupo concentrado de mazada, CAK: Grupo concentrado de aceite de krill. Letras diferentes a la derecha, marcan diferencias significativas entre los grupos suplementados ($p < 0.05$).

El contenido en clases lipídicas del HP se compuso principalmente de Col, FC y FE (~40%, ~25% y ~20% respectivamente), y mostró una distribución similar a las regiones cerebrales descritas anteriormente (CF, CT y CO). Lamaziere *et al* (2011), describen la distribución de FL en diferentes partes de cerebro de ratas Wistar, y observaron concentraciones del mismo orden para FE y FC en el estudio de corteza, HP y núcleo estriado del cerebro.

Los valores obtenidos en la composición de los animales de cada grupo no mostraron diferencias significativas en las clases lipídicas analizadas, a excepción del contenido en Cer, que fue significativamente menor en el grupo suplementado con CMz+CAK respecto al grupo Control. Otros autores como Favreliere *et al.* (2003), al suplementar con dietas enriquecidas en LP procedentes de huevo o de cerebro porcino a ratas Wistar en edades entre 2, 18 y 21 meses no encontraron diferencias significativas en el contenido de FE, plasmenil-etanolamina y FS del HP cuando el aporte de LP procedió de huevo, y sólo reportaron un incremento de FE en el HP con el aporte de

LP de cerebro porcino. En esta misma línea, otros estudios en los que se suplementó con una dieta rica en DHA, como el realizado por Lamaciere *et al.* (2011) mencionado anteriormente, tampoco obtuvieron diferencias significativas en la cantidad de FE y FC en corteza, HP, ni núcleo estriado en ratas Wistar, aunque sí observaron diferencias en la distribución de determinadas especies moleculares de FE y FC.

Por otro lado, en cuanto al menor contenido de ceramidas (Cer) observado en el Grupo suplementado con la mezcla de LP (Grupo CMz+CAK) respecto al Grupo C (AO) (Figura 5.20.), existe una amplia literatura enfocada al estudio de composición de Cer y su relación con enfermedades neurodegenerativas (Jana *et al.*, 2009). Las Cer, cuya estructura se basa en la unión de un AG a una esfingosina, son moléculas precursoras de otros lípidos complejos como los esfingolípidos (SL, como la EM) o cerebrósidos (Hejazi *et al.*, 2011). Las Cer, por sí mismas, son moléculas de señalización asociadas habitualmente a procesos de apoptosis (Hannun y Obeid, 2008), si bien, ha sido reportado por numerosos autores la vinculación de una alteración en el metabolismo de los SL en la que se produce la acumulación de Cer en cerebro, y su relación con procesos neurodegenerativos al estar involucradas en un incremento de procesos de estrés oxidativo (Cutler *et al.*, 2004, Marcks *et al.*, 2007).

En base a estos antecedentes, el menor contenido en Cer observado en el grupo suplementado con LP de CMz y CAK de manera conjunta estaría relacionado con un estado menos proclive a procesos de estrés oxidativo y de apoptosis.

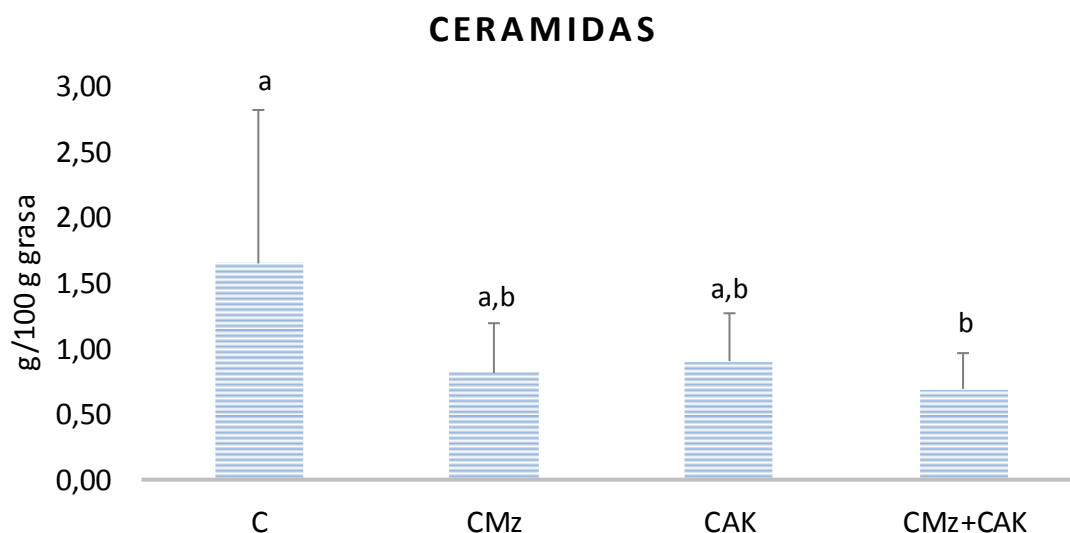


Figura 5.20. Contenido en ceramidas de los grupos suplementados. C: Grupo Control, CMz: Grupo concentrado de mazada, CAK: Grupo concentrado de aceite de krill. Letras diferentes marcan diferencias significativas entre los grupos suplementados para cada tejido ($p < 0.05$).

Composición en ésteres metílicos de ácidos grasos (CG-MS)

La composición en EMAG se detalla en la Tabla 5.16.

La composición en AG del HP, al igual que se describió previamente entre CT, CF y CO, mostró la misma distribución en AG respecto a estas regiones cerebrales, donde los AG mayoritarios fueron C16, C18, C18:1 n-9, C20:4 (n-6) y C22:6 (n-3) (Tabla 5.15.).

Tabla 5.16. Composición en ésteres metílicos de los ácidos grasos de hipocampo (g/100g grasa).

% EMAG	Hipocampo							
	Grupos suplementados							
	C		CMz		CAK		CMz+CAK	
	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE
C14	0,57 ± 0,70		0,60 ± 0,62		0,39 ± 0,31		0,25 ± 0,12	
DMA16	2,30 ± 0,32		2,00 ± 0,50		2,12 ± 0,48		1,78 ± 0,64	
C16	26,96 ± 4,54		31,19 ± 4,13		29,14 ± 4,11		30,73 ± 5,47	
C16:1	0,47 ± 0,21		0,44 ± 0,22		0,34 ± 0,12		0,32 ± 0,11	
DMA18	3,49 ± 0,70		3,00 ± 1,01		3,21 ± 0,67		2,75 ± 1,09	
C17:1	1,13 ± 0,45 a		0,86 ± 0,62		0,91 ± 0,27		0,62 ± 0,28 b	
C18	20,78 ± 2,80		22,44 ± 4,19		22,05 ± 3,48		24,74 ± 4,68	
C18:1 c9	17,54 ± 2,29		18,24 ± 1,68		18,43 ± 2,04		19,23 ± 2,97	
C18:1c11	2,88 ± 0,43		2,91 ± 0,66		2,95 ± 0,35		3,10 ± 0,68	
C18:2 n6	0,75 ± 0,54		1,02 ± 1,43		0,68 ± 0,53		0,46 ± 0,28	
C20	0,48 ± 0,63		0,10 ± 0,01		0,06 ± 0,01		0,10 ± 0,02	
C18:3 n3	0,99 ± 0,39		0,84 ± 0,36		0,77 ± 0,22		0,69 ± 0,30	
C20:1	0,30 ± 0,23		0,16 ± 0,02		0,07 ± 0,03		0,21 ± 0,16	
C20:3 n6	0,38 ± 0,31		0,12 ± 0,07		0,19 ± 0,14		0,17 ± 0,06	
C20:4 n6	10,27 ± 3,56		8,18 ± 3,22		8,90 ± 4,01		6,87 ± 5,52	
C24	0,26 ± 0,05		0,18 ± 0,05		0,21 ± 0,04		0,22 ± 0,15	
C22:6 n3	7,81 ± 2,98		5,93 ± 2,54		7,07 ± 4,01		6,02 ± 5,45	
ΣAGS	55,43 ± 6,09		60,09 ± 5,91		57,74 ± 6,25		60,91 ± 8,37	
ΣAGMI	22,13 ± 2,41		22,49 ± 2,39		22,65 ± 2,45		23,32 ± 3,49	
ΣAGPI	22,51 ± 7,63		17,42 ± 6,30		19,61 ± 8,34		15,77 ± 11,61	
Σn6	11,16 ± 3,87		8,93 ± 3,55		9,64 ± 3,73		7,32 ± 5,46	
Σn3	8,66 ± 3,08		6,60 ± 2,54		7,89 ± 3,98		6,73 ± 5,30	
ΣDMA	5,79 ± 0,98		4,99 ± 1,42		5,33 ± 1,13		4,53 ± 1,73	
ΣAgr	1,09 ± 0,39		0,79 ± 0,53		0,77 ± 0,24		0,61 ± 0,19	
Σn.i.	2,53 ± 1,08		1,87 ± 0,69		2,06 ± 0,72		1,71 ± 1,00	

DMA: dimetilacetales, AGS: ácidos grasos saturados, AGMI: ácidos grasos monoinsaturados, AGPI: ácidos grasos poliinsaturados, AGr: ácidos grasos ramificados, AGm; ácidos grasos minoritarios. n.i.: no identificados,

En la composición obtenida de AG del HP de los animales del grupo CMz+CAK, se observó un menor contenido en el AG de cadena impar C17:1 respecto al grupo C.

Los AG de cadena impar se encuentran en cantidades minoritarias en los tejidos corporales (aproximadamente el 1% sobre el total de la grasa), si bien, se encuentran incorporados preferentemente en los SL de cerebro (Hajra y Radin, 1962, Fonteh *et al.*, 2014). Sin embargo, la literatura acerca del papel de este AG en cerebro es escasa y no describe cómo afecta el contenido de C17:1 en tejidos cerebrales y su vinculación con posibles efectos en el sistema cognitivo. Recientemente Fonteh *et al.* (2014) publicaron la distribución de AG de líquido cefalorraquídeo entre individuos sanos y pacientes con deterioro cognitivo y observaron menores niveles de determinados AG en pacientes con EA, entre los que se encontraban AGPI n-3 y AG de cadena impar, principalmente saturados (C15 y C17), sin embargo, no reportan información acerca de la implicación de los AG de cadena impar en enfermedades neurodegenerativas.

4.9.4. Composición lipídica del cerebelo

El cerebelo (CB) ha sido caracterizado durante mucho tiempo, como la parte cerebral encargada de recibir y controlar las órdenes que le llegan de la corteza cerebral para enviarlas al aparato locomotor, por lo que su función principal estaba dirigida principalmente a tareas como el equilibrio y control de la motricidad (Fine *et al.*, 2002). Sin embargo, en los últimos años se ha investigado intensamente acerca de la relación del CB con las funciones cognitivas como la atención o el aprendizaje. Esta función se ha relacionado estrechamente con la conexión que se establece entre determinadas partes del CB con otras partes del cerebro, como la corteza cerebral (Buckner, 2013), por lo que su composición lipídica ha sido objeto de estudio para determinar su relación con las enfermedades neurodegenerativas, como la EA, y el daño oxidativo que se genera en el curso de estas enfermedades (Nunomura *et al.*, 2012; Bradley *et al.*, 2010).

En base a lo descrito, se ha considerado de gran interés llevar a cabo el análisis de la composición lipídica del CB de los animales suplementados con LP.

Composición en clases lipídicas (HPLC-ELSD)

La distribución en CL del CB se detalla en la Tabla 5.17.

Tabla 5.17. Distribución de clases lipídicas en cerebelo (CB) de las ratas suplementadas (g/100g grasa).

% CLASE LIPÍDICA	Cerebelo							
	Grupos suplementados							
	C		CMz		CAK		CMz+CAK	
	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE
DG	0,56 ±	0,27	0,52 ±	0,11	0,53 ±	0,13	1,10 ±	1,84
AGL+Col	39,08 ±	13,17	37,37 ±	6,76	32,10 ±	8,10	36,17 ±	10,27
MG	1,39 ±	0,65	2,15 ±	1,85	1,68 ±	1,46	2,21 ±	1,52
Cer	3,95 ±	1,14	3,01 ±	0,42	2,94 ±	1,56	2,70 ±	1,56
Gangliósidos	10,45 ±	2,47	10,13 ±	2,16	12,17 ±	2,60	11,41 ±	2,59
Sulf	1,06 ±	0,47	0,76 ±	0,59	0,75 ±	0,43	1,12 ±	0,67
AF	0,58 ±	0,74	0,51 ±	0,59	0,42 ±	0,16	0,49 ±	0,23
FE	19,36 ±	6,51	19,96 ±	5,96	23,13 ±	4,84	19,36 ±	9,02
FI	0,64 ±	0,53	0,77 ±	0,60	0,58 ±	0,30	0,52 ±	0,34
FS	2,54 ±	0,85	2,25 ±	1,10	2,17 ±	0,88	2,51 ±	0,96
FC	19,13 ±	5,71	21,27 ±	6,42	22,21 ±	3,48	21,19 ±	3,87
EM	1,27 ±	0,81	1,29 ±	0,77	1,31 ±	0,52	1,15 ±	0,46
Σ LP	42,94 ±	11,91	45,55 ±	7,29	49,41 ±	8,01	44,73 ±	11,20

DG: diglicéridos, AGL+Col: ácidos grasos libres y colesterol, MG: monoglicéridos, gangliósidos: gangliósidos, Cer: ceramidas, Sulf: sulfatidas, AF: ácido fosfatídico, FE: fosfatidiletanolamina, FI: fosfatidilinositol, FS: fosfatidilserina, FC: fosfatidilcolina, EM: esfingomielina, LP: lípidos polares. Grupo Control, CMz: Grupo concentrado de mazada, CAK: Grupo concentrado de aceite de krill.

La distribución de CL en CB siguió el mismo perfil que el observado en las cortezas cerebrales e HP descritos anteriormente, con Col y LP (principalmente FE y FC) como componentes mayoritarios, seguidos de una menor presencia en DG, MG, Cer, gangliósidos, Sulf, FI, FS y SM. En esta región del cerebro no se encontraron diferencias significativas entre los grupos suplementados. Si bien, se observaron tendencias en las que se siguió el mismo comportamiento que el encontrado en CT, CF o HP, al mostrar incrementos (no significativos) de gangliósidos, así como una disminución de ceramidas en la dieta suplementada con LP de Mz y AK de manera conjunta, respecto a la dieta del grupo C (Figura 5.21.)

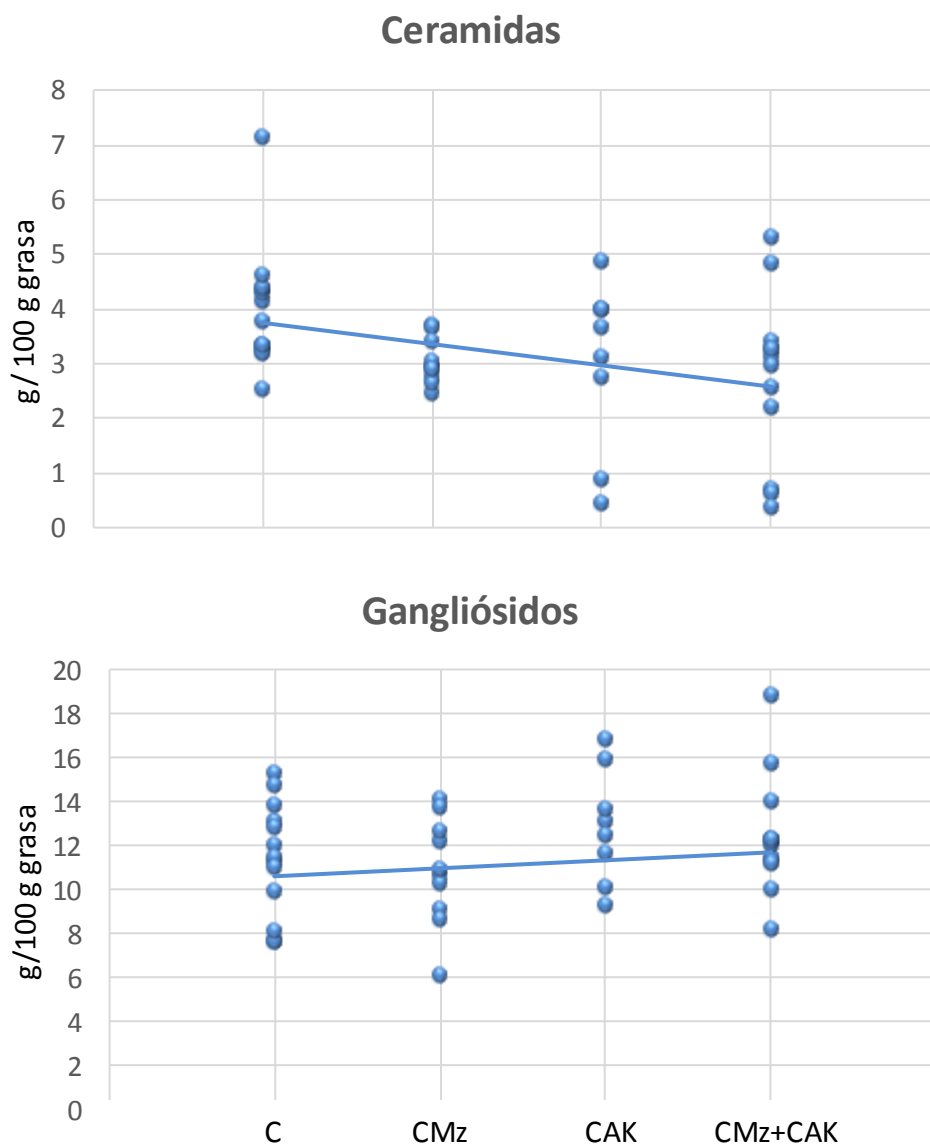


Figura 5.21. Dispersión de los animales alimentados con las diferentes dietas suplementadas y línea de tendencia en el contenido de ceramidas y gangliósidos del cerebelo. De izquierda a derecha en cada figura: Grupo C, Grupo CMz, Grupo CAK, Grupo CMz+CAK.

Composición en ésteres metílicos de ácidos grasos (CG-MS)

En la Tabla 5.18. se detalla la composición en EMAG en cerebelo de los grupos suplementados.

La distribución de AG obtenida en CB de los animales suplementados, se compuso principalmente de C16:0, C18:0, C18:1 c9, C20:4 n6 y C22:6 n3. Estos datos, están de acuerdo con los reportados por Rahman *et al.*, (2010) que analizaron el perfil de AG de corteza cerebral, CB e HP en ratones macho y mostraron igualmente un mayor

contenido en los AG mencionados en todas las partes de cerebro analizadas. En otro estudio realizado por Valenzuela *et al.*, (2015), mostraron la distribución de AG de cerebro de ratones macho, con un contenido en C16:0, C18:1n9, AA y DHA de 26%, 22%, 8% y 3% g/100g FAME, así como un total de 48% AGS, 31% AGMI y 21% AGPI, valores similares a los obtenidos en CB, así como en el resto de las regiones de cerebro analizadas en el presente trabajo (Tabla 5.18).

Tabla 5.18. Distribución de ésteres metílicos de ácidos grasos del cerebelo (CB) de ratas suplementadas.

% EMAG	Cerebelo							
	Grupos suplementados							
	C		CMz		CAK		CMz+CAK	
	media	DE	media	DE	media	DE	media	DE
C14	0,25 ± 0,15		0,18 ± 0,09		0,24 ± 0,26		0,16 ± 0,08	
DMA16	2,69 ± 0,51		2,01 ± 0,77		2,40 ± 0,43		1,82 ± 1,22	
C16	23,98 ± 3,41		25,66 ± 2,92		22,77 ± 3,39		24,33 ± 5,27	
C16:1	0,47 ± 0,14		0,54 ± 0,38		0,47 ± 0,11		0,50 ± 0,14	
DMA18	3,32 ± 0,68		3,06 ± 0,57		3,47 ± 0,77		2,50 ± 1,33	
C17:1	3,24 ± 0,85 a		2,66 ± 0,36		2,93 ± 0,44		2,33 ± 1,09 b	
C18	17,59 ± 2,23		18,20 ± 1,80		16,24 ± 1,93		18,34 ± 4,04	
C18:1c9	21,90 ± 2,21		23,19 ± 2,00		21,04 ± 1,95		23,35 ± 4,32	
C18:1c11	6,10 ± 0,39		6,52 ± 0,82		5,65 ± 0,63		6,54 ± 1,34	
C18:2 n6	0,94 ± 0,24		0,82 ± 0,21		1,11 ± 0,25 a		0,77 ± 0,29 b	
C20	0,35 ± 0,12		0,21 ± 0,05		0,22 ± 0,03		0,24 ± 0,07	
C18:3 n3	3,55 ± 0,94		3,66 ± 0,80		3,58 ± 0,60		3,82 ± 1,25	
C20:1	1,04 ± 0,46		0,82 ± 0,34		0,82 ± 0,15		1,02 ± 0,29	
C20:3 n6	0,36 ± 0,22		0,18 ± 0,07		0,25 ± 0,15		0,34 ± 0,11	
C20:4 n6	5,48 ± 2,55		4,46 ± 2,06		6,41 ± 1,79		4,61 ± 3,92	
C24	0,29 ± 0,07		0,27 ± 0,09		0,29 ± 0,08		0,32 ± 0,08	
C22:6 n3	5,35 ± 3,81		5,30 ± 3,19		9,29 ± 3,39		6,68 ± 6,35	
ΣAGS	50,15 ± 4,32		50,81 ± 3,10		46,96 ± 4,19		48,90 ± 6,83	
ΣAGMI	32,51 ± 1,54		33,20 ± 2,70		30,43 ± 2,33		33,24 ± 4,79	
ΣAGPI	17,69 ± 5,82		15,45 ± 5,50		22,14 ± 6,14		17,40 ± 11,34	
Σn6	6,78 ± 2,60		5,46 ± 2,09		7,77 ± 1,86		5,72 ± 4,14	
Σn3	8,93 ± 3,43		8,98 ± 2,99		12,93 ± 3,94		10,55 ± 6,57	
ΣAGr	1,75 ± 0,50		1,44 ± 0,26		1,56 ± 0,22		1,26 ± 0,64	
ΣAGm	0,18 ± 0,07		0,17 ± 0,07		0,11 ± 0,02		0,12 ± 0,02	
Σn.i.	1,26 ± 0,57		0,95 ± 0,48		1,41 ± 0,45		1,10 ± 0,81	

Grupo Control, CMz: Grupo concentrado de mazada, CAK: Grupo concentrado de aceite de krill. Letras a la derecha de los valores, indican diferencias significativas entre Grupos suplementados ($p < 0.05$).

5. CONCLUSIONES PARCIALES

El estudio lipidómico de los tejidos de los animales suplementados con dietas enriquecidas en LP de Mz, y/o AK, ha demostrado que la composición lipídica de la dieta influye de forma diferente en la distribución y composición de lípidos de distintos tejidos. En concreto, la suplementación de la dieta con LP de Mz y AK de manera conjunta (CMz+CAK) ha generado un efecto en la modificación de la distribución de lípidos de los tejidos analizados respecto a los resultados obtenidos en la suplementación por separado, lo que podría considerarse como un efecto sinérgico entre los distintos componentes lipídicos presentes en ambos suplementos (LP lácteos y marinos). Así, se han observado variaciones en diferentes parámetros relacionadas con una potencial protección frente a procesos neurodegenerativos, relacionada con la disminución de AGPI n-6 en el perfil lipídico de Erit, plasma, TAS, TAV, la región cerebral de la CT y la disminución de ceramidas en HP. Además, se ha observado el incremento de AGPI n-3 en plasma, TAS y TAV y de gangliósidos en las regiones cerebrales de CT y CO.

Sin embargo, para confirmar los resultados del análisis lipidómico obtenidos en este capítulo, sería necesario realizar estudios que relacionen las dietas suministradas con el estado cognitivo y de comportamiento de los animales tal y como se desarrolla en el siguiente capítulo.

**6. EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN DIETÉTICA CON
LÍPIDOS POLARES EN EL COMPORTAMIENTO COGNITIVO
Y CONDUCTUAL DE RATAS DE EDAD AVANZADA**

CAPÍTULO VI: EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN DIETÉTICA CON LÍPIDOS POLARES EN EL COMPORTAMIENTO COGNITIVO Y CONDUCTUAL DE RATAS DE EDAD AVANZADA

1. INTRODUCCIÓN

El efecto beneficioso de LP, entre los que se encuentra la FS, EM y LP que incorporan en su estructura AGPICL n-3, a nivel cognitivo, incluye numerosos estudios a diferentes niveles. Así, en la literatura actual podemos encontrar, la relación de la suplementación de la dieta en LP, con la alteración de neurotransmisores y metabolitos implicados en la señalización neuronal (Henebelle *et al*, 2012; Wong *et al*, 2014; Astarita *et al*, 2010), el efecto provocado en la composición lipídica de tejidos neuronales (como ya se ha descrito en el Capítulo V), o el estudio del nivel cognitivo y conducta de animales. En este contexto, se hace imprescindible la evaluación de la relación entre las modificaciones orgánicas y/o metabólicas por efecto de la dieta, con el estudio del comportamiento y conducta que desarrollan los animales tras la suplementación de la dieta para poder extrapolar y concluir efectos en el estado cognitivo de una manera precisa. Para ello, se llevan a cabo pruebas comportamentales, que ya desde los años 40, vinculan factores como capacidad de escape o generación de estrés ante situaciones adversas con la actividad cerebral, dando respuesta al estado cognitivo de los animales (Polanco *et al*, 2011).

2. OBJETIVOS

En base a los antecedentes expuestos, el objetivo del presente capítulo fue evaluar el efecto de la suplementación de la dieta con lípidos polares de fuentes marinas (krill) y lácteas (mazada), en el comportamiento cognitivo y conductual de ratas de edad avanzada.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Elaboración de los complementos ricos en lípidos polares

Este apartado ha sido descrito con detalle en el apartado “3.1.” del CAPÍTULO VI.

3.2. Animales y diseño experimental

3.2.1. Diseño experimental

Este apartado ha sido descrito con detalle en el apartado “3.2.” del CAPÍTULO VI.

3.2.2. Pruebas conductuales y cognitivas

Una vez finalizado el periodo de 3 meses de suplementación de la dieta de los animales que formaban parte tanto de los grupos experimentales, como control, se iniciaron las pruebas de comportamiento. Durante los tres días anteriores al comienzo de las pruebas, los animales fueron acostumbrados a su manipulación a diario por el experimentador, para habituarles a este proceso. La manipulación consistió en el transporte desde el estabulario hasta la habitación en donde en los días posteriores se realizaron las pruebas experimentales, allí permanecieron dos minutos en las manos del experimentador.

➤ Laberinto en cruz elevado (LCE)

El LCE es una prueba validada para el estudio de la ansiedad en roedores, se basa en la aversión que éstos experimentan a la altura y a los espacios abiertos (Lister, 1987). Se ha visto que el porcentaje de tiempo empleado en la exploración de los brazos abiertos es el parámetro que mejor estima los niveles de ansiedad del animal (Pellow *et al.*, 1985).

Esta prueba se llevó a cabo en un aparato con 4 brazos (2 abiertos y 2 cerrados) de 45 x 10 cm dispuestos en forma de cruz y elevados a una altura de 65 cm desde el suelo (Figura 6.1.). Los brazos se encuentran cerrados por una pared de 50 cm de altura. Estos cuatro brazos se unen a través de una plataforma central de 10 x 10 cm.

El comportamiento de cada animal fue monitorizado por una cámara de vídeo encima del centro del aparato y analizado por un sistema computacional (EthoVision 3.0, Noldus IT, Wageningen, Holanda).

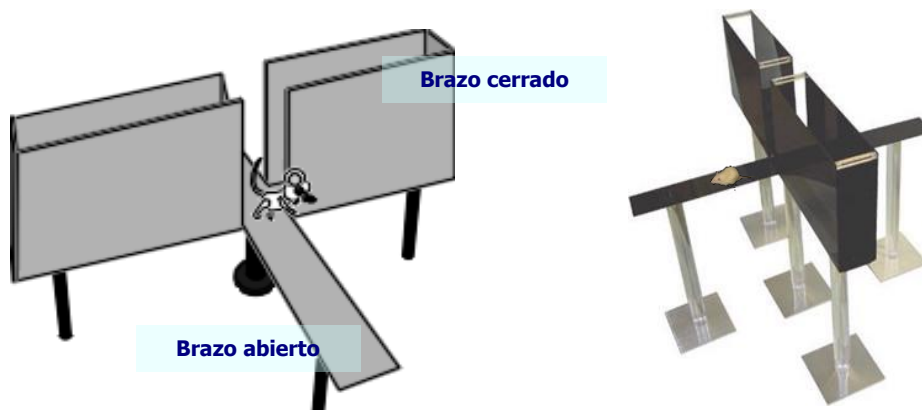


Figura 6.1. Representación y esquema del LCE

Al inicio de la prueba, la rata era colocada en la plataforma central con la cabeza mirando hacia uno de los brazos cerrados y dejándola en completa libertad de movimiento, mientras se registró su conducta a lo largo de la sesión. La duración de cada sesión fue de 5 minutos.

Las medidas que se registraron durante cada sesión fueron:

- Tiempo de permanencia en cada zona del laberinto: brazos abiertos, brazos cerrados y plataforma central. Se registró el tiempo total en segundos así como el porcentaje de tiempo con respecto al total.
- Número de entradas a cada brazo.
- Número de veces y tiempo (en segundos y porcentaje) que el animal asomó la cabeza por encima del borde de cualquiera de los brazos abiertos (equivalente al término *head-dipping*).

➤ Prueba de aprendizaje espacial

La prueba de aprendizaje espacial fue desarrollada por Richard Morris (Morris et al, 1982). Se utilizó un laberinto acuático que consistió en un estanque circular de PVC negro de 2 m de diámetro y 45 cm de alto. En uno de los 4 cuadrantes en los que se divide la piscina virtualmente, se coloca una plataforma negra circular de 11

centímetros de diámetro, cuyo centro queda equidistante de la pared y del centro de la piscina. La superficie de la misma consta de una rejilla metálica que facilita que los animales no resbalen al subir. Alrededor de la piscina y por fuera de ésta, hay cortinas de diferente color sobre las que se sitúan además motivos de colores y texturas variadas, cuya posición se mantiene durante todo el experimento y que sirven de claves de referencia para que el animal sitúe la localización de la plataforma con respecto a dichas señales (Figura 6.2a y 6.2b.).

En cada sesión la piscina se llenó con agua a una temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ hasta alcanzar una profundidad de 32 centímetros sobre el fondo de la misma. Esto permitía que, durante las sesiones de entrenamiento, la plataforma permaneciera escondida para los animales al quedar a 2 centímetros por debajo de la superficie del agua.

Para realizar los análisis correspondientes, la piscina se divide virtualmente en cuatro cuadrantes de igual medida, diferenciando una zona central de 160 cm de diámetro y un pasillo periférico de 20 cm. En la mitad de uno de los cuadrantes se encuentra la plataforma de escape y a su alrededor se definió un área virtual de 20 cm de diámetro que nos ayudaría a evaluar la persistencia de los animales en buscar la posición exacta de la plataforma y que denominamos AP (área alrededor de la plataforma) (Figura 6.2a y 6.2b.).

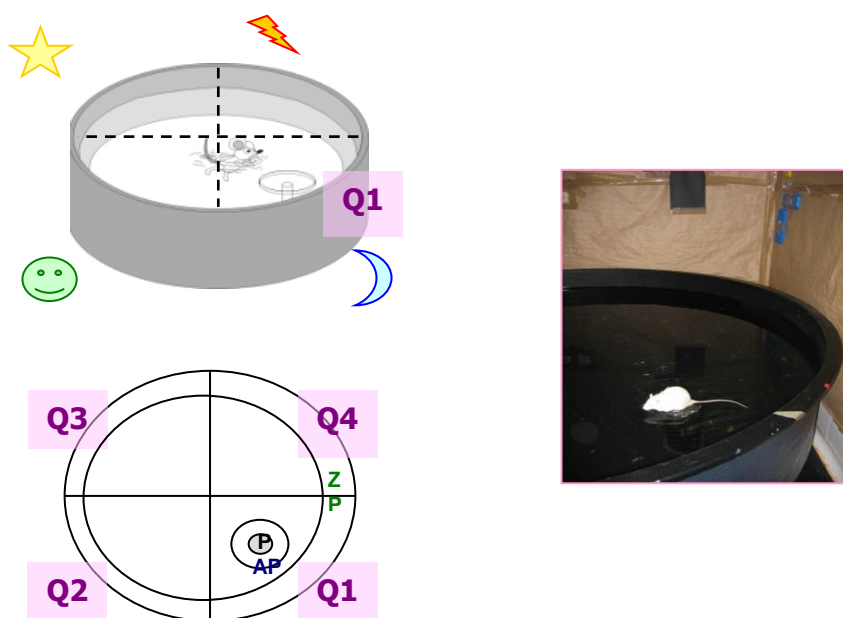


Figura 6.2a. Representación y esquema del laberinto acuático de Morris, donde Q1 es el cuadrante diana y Q3 es el cuadrante opuesto. P: plataforma AP: área que rodea la plataforma ZP: zona periférica de la piscina

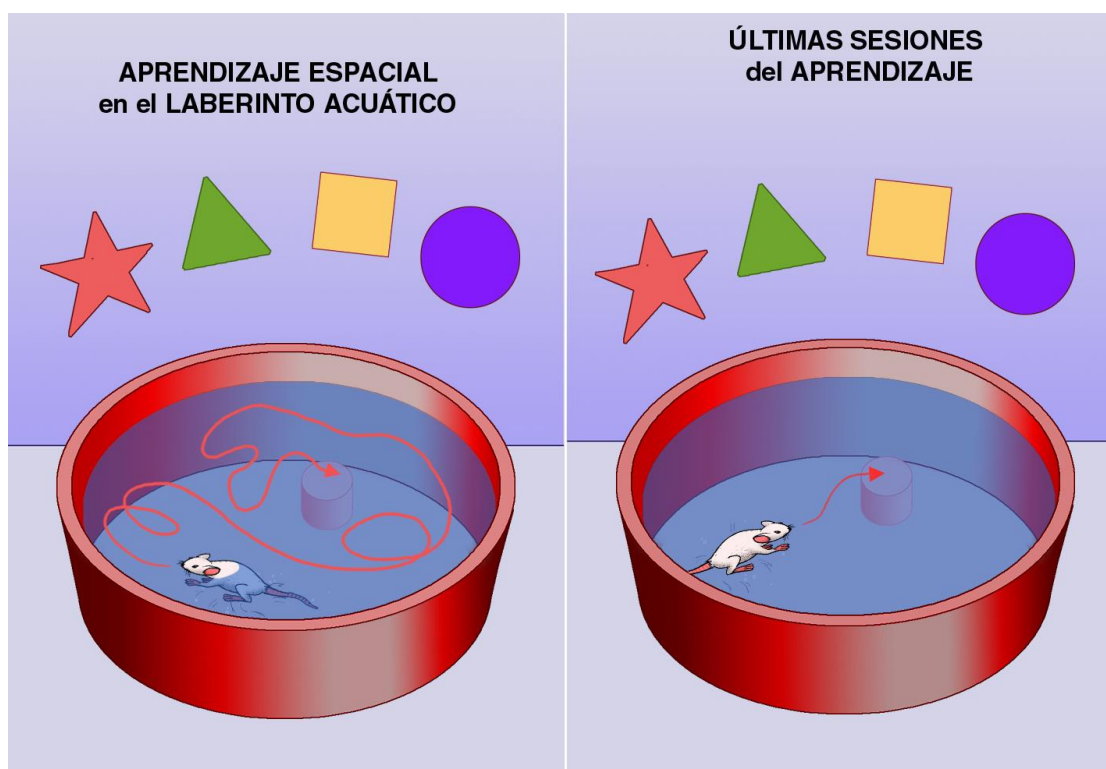


Figura 6.2b. Representación del aprendizaje espacial en el laberinto acuático.

Se determinaron cuatro posiciones de comienzo alrededor del perímetro de la piscina que se usaron de forma aleatoria en cada sesión, aunque dicho orden fue el mismo para cada rata perteneciente a un mismo experimento.

Cada ensayo comenzaba situando la rata en el agua con el cuerpo orientado hacia la pared de la piscina, en una de las posiciones de comienzo. Tras el último ensayo de la sesión correspondiente, la rata era llevada a la habitación adyacente dejándose en una jaula individual cercana a una fuente de calor para facilitar su secado. Una vez la que rata estuvo seca, se devolvió al estabulario.

El aprendizaje espacial en el laberinto acuático de Morris se evaluó, dependiendo de cada experimento, mediante diferentes *test* o pruebas, que se detallan a continuación:

1) Sesión/es de entrenamiento: en función del protocolo experimental y de los objetivos de cada experimento particular, el entrenamiento consistió en dos o tres sesiones por día. El número de ensayos por sesión osciló también entre tres y cuatro. El tiempo máximo de cada ensayo fue de 120 segundos y en caso de que la rata no encontrara la plataforma, fue guiada con la mano hasta la misma. Una vez allí, el

animal permanecía sobre la plataforma durante 30 segundos más. Transcurrido este periodo de tiempo, era colocado sobre una toalla y llevado al exterior de las cortinas que rodeaban la piscina donde permanecía otros 30 segundos, antes de comenzar un nuevo ensayo.

2) Prueba de memoria: evalúa la fuerza con la que se ha establecido la memoria espacial 24 horas después de la última sesión de entrenamiento. Consistió en un único ensayo, de 60 segundos, durante el cual el animal nadó libremente en la piscina de la que previamente se ha retirado la plataforma. El recuerdo puede evaluarse por la latencia en localizar el enclave exacto donde estuvo situada la plataforma, así como por la frecuencia de los cruces sobre el enclave donde estuvo la plataforma o el porcentaje de tiempo dedicado a la búsqueda en el cuadrante diana (cuadrante donde estuvo localizada la plataforma durante el entrenamiento).

Medidas registradas durante el entrenamiento y la prueba de retención:

- Latencia o tiempo total que las ratas necesitaron para localizar la plataforma el enclave exacto donde estuvo previamente emplazada (en segundos).
- Distancia recorrida por los animales hasta la localización de la plataforma (en centímetros).
- Velocidad media de natación (en centímetros/segundo).
- Porcentaje de tiempo durante el cual las ratas nadaron en el cuadrante diana y en AP en el caso de la prueba de memoria.
- Porcentaje de tiempo durante el cual las ratas nadaban en la zona central y en la periférica (tigmotaxis).

➤ **Condicionamiento del miedo (CM)**

Se trata de un modelo utilizado para evaluar tanto el aprendizaje como la memoria de tipo emocional.

Este tipo de aprendizaje se llevó a cabo en cajas tipo Skinner (29x37x25 cm) con 20 varillas metálicas en el suelo (la distancia entre varillas es de 1.5 cm y su diámetro es de 4 mm) y, debajo de éstas, una bandeja con viruta (Figura 6.3.). Cada caja está emplazada dentro de una cámara de aislamiento de dimensiones internas: 61,5x43x45 cm y exteriores 70x51, 5x53 cm. La pared frontal es una pantalla de plexiglás roja, a fin de facilitar la observación de la conducta del animal. Esta cámara está equipada con un sistema de ventilación que emite un sonido monótono de 68 dB y una luz de 20 W, cuya función es aislar el módulo acústica y lumínicamente del exterior.

Se utilizó como *estímulo incondicionado* una descarga eléctrica de 0,4 mA de intensidad administrada mediante un sistema automático controlado por el programa SKINNER versión 1,2 de la empresa CIBERTEC, S.A., y un circuito generador de descargas eléctricas de corriente constante de la empresa LETICA Instrumentos Científicos (LI100-26 Shocker), cuyo suministro depende de la intensidad del valor seleccionado y no de la resistencia que proporciona el cuerpo del animal, de modo que los animales de cada grupo reciben exactamente la misma intensidad de choque eléctrico. El *estímulo condicionado*, en el caso del condicionamiento de miedo al tono y de la inhibición latente, fue un tono de 85 dB y una frecuencia de 1000 Hz.

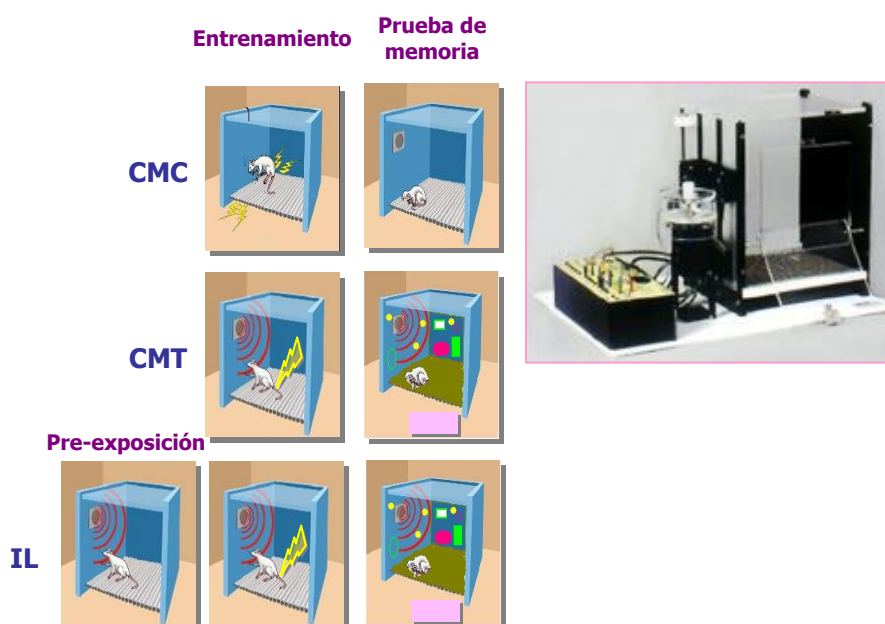


Figura 6.3. Representación y esquema de los protocolos de condicionamiento del miedo: CMC (condicionamiento del miedo al contexto), CMT (condicionamiento del miedo al tono), IL (inhibición latente).

El Condicionamiento del miedo constó de las siguientes fases:

- Día 1: 2 min acondicionamiento + [20 segundos tono + 1 segundos shock (0.4mA) + 39 segundos sin nada] 3 repeticiones.
- Día 2: 5 min sin/shock/ventilador
- Día 3: cambio de contexto- sin ventilador, cambio de aroma. 3 min acondicionamiento + [20 segundos tono + 40 segundos sin nada] 5 repeticiones.

1) Entrenamiento: cada rata se colocó en el interior de una caja de condicionamiento. En un período inicial de 120 segundos, los sujetos exploraron libremente la jaula. A continuación se emitió un tono de 1000 Hz durante 20 segundos e inmediatamente después un choque eléctrico en las patas. En total se aplicaron 3 descargas eléctricas con un intervalo de separación entre éstas de 1 minuto y dejando 30 segundos tras la última descarga. Inmediatamente después los animales fueron devueltos a su jaula.

2) Prueba de memoria de condicionamiento del miedo al contexto: 24 horas después del entrenamiento, las ratas fueron expuestas de nuevo a la misma caja (mismo contexto) donde habían sido entrenadas, pero en ausencia de tono o descargas y se registró su conducta de miedo durante 5 minutos.

3) Prueba de memoria de condicionamiento del miedo al tono: 48 horas después del entrenamiento, el animal se introdujo en una caja de diferentes características y olor la utilizada para el entrenamiento. Durante los 3 primeros minutos se permitió que los animales exploraran libremente y después se les presentó el tono durante 5 minutos.

Test de sensibilidad al shock

Para confirmar si las dietas afectan a la sensibilidad de los animales al choque eléctrico, 24 después de terminar la prueba de memoria de condicionamiento al tono, los animales fueron situados en una caja de condicionamiento con claves contextuales distintas a las usadas en el condicionamiento. Al cabo de 120 s, cada rata recibió una serie ascendente de un choque eléctrico en las patas de 1 s de duración, empezando por una intensidad de 0,05 mA, e incrementando la intensidad cada 20 segundos en 0,05 mA, hasta que el animal mostró el primer signo de molestia y dolor (el animal levanta las patas de la rejilla del suelo, salta y/o emite vocalizaciones).

3.3. Estudio estadístico

En el análisis estadístico, se realizó un análisis exploratorio de los datos para comprobar si existía una distribución normal y homogeneidad de la varianza. Los resultados estadísticos fueron obtenidos mediante el test no paramétrico Kruskal-Wallis. El programa utilizado para ello fue el paquete SPSS (SPSS 22.0 for Windows, SPSS inc. IBM, Armark, Nueva York, EEUU). El nivel de significancia se fijó en 95%.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Evaluación conductual y cognitiva

4.1.1. Efecto de la dieta en el estado de ansiedad de los animales en el laberinto en cruz elevado

Para evaluar el estado de ansiedad de los animales se analizó el porcentaje de tiempo que las ratas permanecían en los brazos abiertos del laberinto en cruz elevado. El análisis estadístico indicó que no había diferencias entre los distintos grupos evaluados ($p>0.05$) (Tabla 6.1.).

Tabla 6.1. Porcentaje de tiempo de permanencia en los brazos abiertos del laberinto en cruz elevado.

	Grupo C		Grupo CMz		Grupo CAK		Grupo CMz+CAK	
	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE
% tiempo permanencia	14,19	± 18,48	6,70	± 12,50	6,73	± 7,33	12,46	± 17,63

Cabe mencionar que no se ha encontrado en la literatura estudios acerca de la relación de la ingesta de LP de fuentes marinas y lácteas, con el estado de ansiedad en animales mediante la prueba del laberinto en cruz elevado. A continuación se describen algunos estudios que aplican esta técnica para diferentes tipos de dietas y con resultados contradictorios.

Los resultados obtenidos por Song *et al* (2008) en la suplementación de ácidos grasos n-3, en concreto EPA, en ratas Wistar macho, tampoco obtuvo diferencias significativas en los resultados de la misma prueba, donde mostraron mismos valores en las relaciones de entrada y relaciones del tiempo que permanecían en el laberinto abierto en los grupos de ratas suplementados con diferentes dietas. Las dietas contenían una composición que consistía en un aporte de 0.5% EPA (n-3), respecto a una dieta control con aporte de aceite de palma, otra dieta con un 0.5% de AA (n-6), y otra dieta con ácido gamma linolénico (18:3 n-6). Por otro lado, Trofimiuk *et al.* (2011), compararon el comportamiento de ratas con las siguientes características: un grupo fue sometido a situaciones de estrés durante 3 semanas, otro grupo, además, consumió aceite de hígado de bacalo (con dosis equivalentes a 70mg de EPA+DHA), un tercer grupo consumió el aceite de hígado de bacalao sin ser sometido a estrés y un último grupo (control), no consumió el aceite de hígado de bacalao ni se sometió a estrés. En los resultados de número de entrada y tiempo de permanencia en brazo abierto, tampoco se mostraron diferencias entre los 4 grupos de estudio. La ingesta en

AG n-3, en el estudio realizado por Moreira *et al* (2010) sí mostró mayores tiempos de permanencia en los brazos abiertos, así como mayores relaciones de entrada/salida, en ratas Wistar macho que se alimentaron de leche materna de ratas que recibieron una dieta a la que se incorporó un 1% de aceite de pescado. Sin embargo, cabe mencionar la comparación de grupos realizada en el estudio que llevaron a cabo, que se compuso de, por un lado, ratas con una dieta deficitaria en AG n-3, respecto al grupo descrito anteriormente.

4.1.2. Efecto de la dieta en la capacidad de aprendizaje espacial

La capacidad de aprendizaje espacial de los animales fue evaluada en el laberinto acuático (MWM). El parámetro utilizado para analizar el efecto de las distintas dietas en el aprendizaje espacial fue la distancia recorrida por los animales hasta alcanzar la plataforma sumergida. Los resultados obtenidos no mostraron diferencias significativas en las distancias recorridas por los distintos grupos experimentales ($p>0.05$) (Tabla 6.2., Figura 6.4a.).

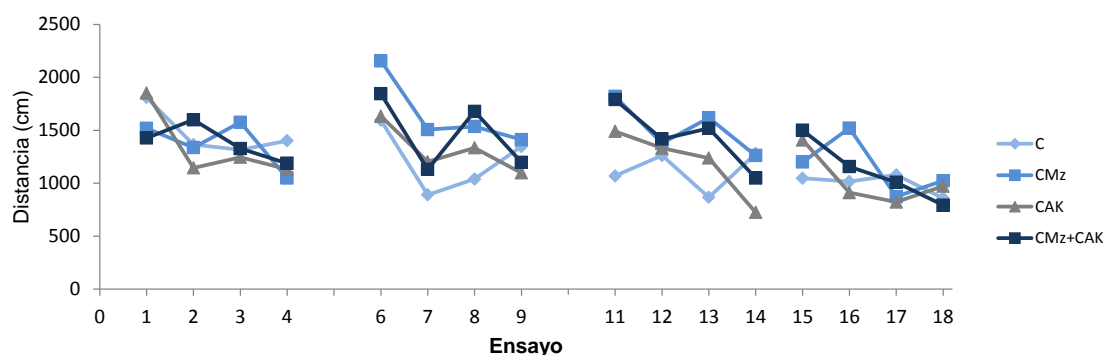


Figura 6.4a. Distancia recorrida (cm) en el laberinto acuático en los ensayos realizados. C: grupo control, CMz: Grupo suplementado con lípidos polares de Mazda, CAK: grupo suplementado con lípidos polares de krill, CMz+CAK: grupo suplementado con lípidos polares de mazada y krill.

La memoria espacial se evaluó 24 h después de que se acabara el cuarto día de entrenamiento eliminando la plataforma sumergida. El tiempo que los animales permanecieron en el área donde previamente se localizaba la plataforma sumergida fue utilizado como medida de la memoria espacial. Los resultados obtenidos no mostraron diferencias significativas entre los grupos experimentales en la memoria espacial ($p>0,05$) (Figura 6.4b.).

CAPÍTULO VI

Tabla 6.2. Distancia recorrida (cm) de los grupos suplementados en los ensayos de aprendizaje espacial (laberinto acuático).

Ensayo	Grupo C		Grupo CMz		Grupo CAK		Grupo CMz+CAK	
	distancia (cm)							
	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE
1	1809,55	± 497,97	1518,55	± 627,02	1852,23	± 247,50	1427,11	± 758,44
2	1365,26	± 648,44	1336,45	± 653,77	1144,56	± 616,85	1599,66	± 601,08
3	1315,59	± 795,07	1576,24	± 651,62	1245,08	± 648,72	1327,27	± 707,45
4	1400,98	± 659,42	1047,81	± 634,00	1131,85	± 753,90	1188,30	± 651,62
6	1594,94	± 968,31	2155,81	± 753,34	1633,19	± 561,34	1844,86	± 671,48
7	890,81	± 722,12	1507,30	± 933,41	1203,13	± 768,97	1131,33	± 905,34
8	1039,65	± 894,08	1535,64	± 795,67	1334,15	± 863,64	1678,92	± 800,80
9	1347,30	± 632,34	1412,24	± 782,98	1097,82	± 578,29	1197,51	± 385,76
11	1069,06	± 897,72	1819,53	± 728,08	1489,60	± 983,82	1790,36	± 1023,81
12	1261,99	± 858,18	1376,43	± 721,77	1331,33	± 613,14	1416,67	± 688,77
13	866,91	± 659,97	1617,10	± 638,58	1237,51	± 775,39	1518,88	± 561,57
14	1281,06	± 659,57	1261,14	± 795,89	724,43	± 575,37	1049,39	± 633,31
15	1047,08	± 887,71	1200,57	± 1071,46	1408,17	± 691,82	1499,70	± 871,76
16	1016,22	± 715,02	1520,45	± 629,30	910,98	± 677,51	1156,68	± 570,22
17	1078,43	± 761,03	873,31	± 792,59	822,24	± 608,21	1008,54	± 803,49
18	859,08	± 762,95	1023,41	± 753,95	971,98	± 624,20	792,97	± 526,26

Tiempo en zona de plataforma

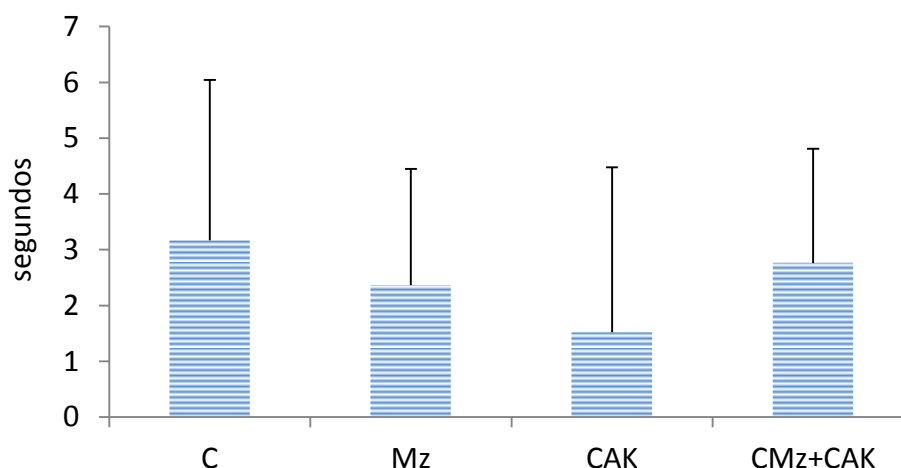


Figura 6.4b. Tiempo de permanencia (segundos) de los grupos experimentales en el área donde se situaba la plataforma sumergida. C: grupo control, CMz: Grupo suplementado con lípidos polares de Mazda, CAK: grupo suplementado con lípidos polares de krill, CMz+CAK: grupo suplementado con lípidos polares de mazada y krill.

Son varios los estudios que evalúan el comportamiento de la descendencia de ratas que han llevado una dieta enriquecida en determinados compuestos nutricionales durante la gestación y/o lactancia para el estudio de las variaciones durante el desarrollo. Gustavsson *et al.* (2010), enriquecieron la dieta de ratas Wistar hembra con un complejo de lípidos lácteos, rico en LP y, además, DHA con dosis a las que llamaron “baja” y “alta” en función del contenido en gangliósidos del complejo (0.01% y

0.05% respectivamente. Los resultados en la descendencia (ratas Wistar macho), no mostraron diferencias entre los grupos ni entre el grupo control, en el tiempo empleado hasta llegar a la plataforma durante 4 días del periodo de adquisición y el quinto día de la prueba espacial. Sin embargo, otros estudios en los que se administraron LP, sí observaron menores tiempos de escape en el MWM, como el realizado por Zhan *et al* (2015), que indujeron enfermedad de Alzheimer (EA) en ratas Wistar de edad avanzada y observaron menores tiempos para encontrar la plataforma cuando se les administró FS en diferentes dosis (15 y 30 mg/kg), respecto a los animales con EA sin la suplementación. Si bien, en el estudio que realizaron no mostraron un grupo control que no padeciera EA. En esta misma línea, Liu *et al.*, (2012), llevaron a cabo un estudio en el que compararon niveles antioxidantes y funciones cognitivas de ratas Sprague-Dawley que fueron complementadas con FS, DHA, o ambos compuestos, respecto a ratas con una dieta control. En todos los ensayos evaluados, observaron un perfil más antioxidante y mejores funciones cognitivas en las dietas que incorporaban FS, DHA, o ambos, sin diferencias significativas entre estos grupos (~6% de tiempo de latencia de escape respecto al grupo control con un ~2%). Además, en el estudio de los niveles de la actividad superóxido dismutasa en hígado, cuya actividad antioxidante se basa en la dismutación de radicales superóxido a peróxido de hidrógeno y oxígeno, fueron superiores cuando la administración era conjunta (FS y DHA) que por separado. Siguiendo en la misma línea, Lee *et al* (2015) evaluaron el efecto de la FS en función de la fuente alimentaria y de la dosis administrada, en ratas Sprague-Dawley de 15 meses. Para ello, dividieron a los animales en dos grupos control: ratas jóvenes (6 semanas) y de edad avanzada (15 meses), 3 grupos suplementados con FS procedente de calamar (con aporte de AG n-3), con dosis de 10, 20 o 50 mg/kg, y un último grupo suplementado con 50 mg/kg de FS procedente de soja (sin aporte de AG n-3). Los resultados obtenidos en el MWM no mostraron diferencias entre los grupos durante la prueba con la plataforma visible, en todos los casos los tiempos para encontrarla, fueron menores en la segunda y tercera prueba respecto a la prueba inicial. Cuando se ocultó la plataforma, en los días 5 y 6 de la prueba, los grupos que consumieron la dosis de 20 y 50 mg/kg de FS de calamar, mostraron tiempos significativamente menores respecto al grupo control de edad avanzada, estos tiempos también fueron significativamente menores en el grupo que consumió FS de soja respecto al grupo control, aunque el efecto fue superior en los grupos de FS de calamar, hecho que estaría relacionado con la composición en AG de esta fuente (13%EPA y 41% DHA, del total de AG en FS).

4.2.3. Efecto de la dieta en la memoria emocional mediante condicionamiento del miedo

Durante la fase de entrenamiento del condicionamiento del miedo no hubo diferencias entre los distintos grupos experimentales en la conducta de inmovilización o congelamiento tras los choques eléctricos ($p>0.05$) (Tabla 6.4., Figura 6.5a.). Sin embargo, en la prueba de memoria de condicionamiento del miedo al contexto, realizada 24 horas después, se observaron diferencias significativas entre los grupos control y los grupos que sólo recibieron el complemento de CMz y el grupo que recibió CAK ($p<0.05$) (Tabla 6.3., Figura 6.5b).

Tabla 6.3. Porcentaje de inmovilización en la fase de entrenamiento de condicionamiento del miedo y condicionamiento del miedo al contexto.

% inmovilización	Grupo C		Grupo CMz		Grupo CAK		Grupo CMz+CAK	
	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE
Pretono- entrenamiento	2,29 ±	3,18	0,30 ±	1,01	0,50 ±	1,58	1,26 ±	2,11
Postono- entrenamiento	43,68 ±	24,37	48,38 ±	30,88	35,58 ±	21,56	34,05 ±	22,07
Miedo al contexto	43,95 ±	24,27 a	22,39 ±	22,58 b	20,27 ±	14,11 b	36,12 ±	27,36 ,b

Por otro lado, durante el condicionamiento del miedo al tono, no se observaron diferencias significativas entre los grupos ($p>0.05$) (Tabla 6.4.).

Tabla 6.4. Porcentaje de inmovilización durante el condicionamiento del miedo al tono.

% inmovilización	Grupo C		Grupo CMz		Grupo CAK		Grupo CMz+CAK	
	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE
Pretono	8,15 ±	6,52	9,91 ±	6,41	9,40 ±	6,21	8,50 ±	7,28
Postono	37,46 ±	29,24	28,36 ±	22,73	19,60 ±	13,23	26,36 ±	35,38

Un día después de que concluyera el test de condicionamiento al tono, se realizó un test de sensibilidad al choque eléctrico. El análisis de los datos indicó que no había diferencias significativas en la respuesta a la sensibilidad al choque eléctrico entre los distintos grupos experimentales ($p>0.05$) (Tabla 6.5).

Tabla 6.5. Sensibilidad al choque eléctrico.

	Grupo C		Grupo CMz		Grupo CAK		Grupo CMz+CAK	
	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE
Sensibilidad	0,16 ±	0,04	0,13 ±	0,05	0,16 ±	0,04	0,17 ±	0,07

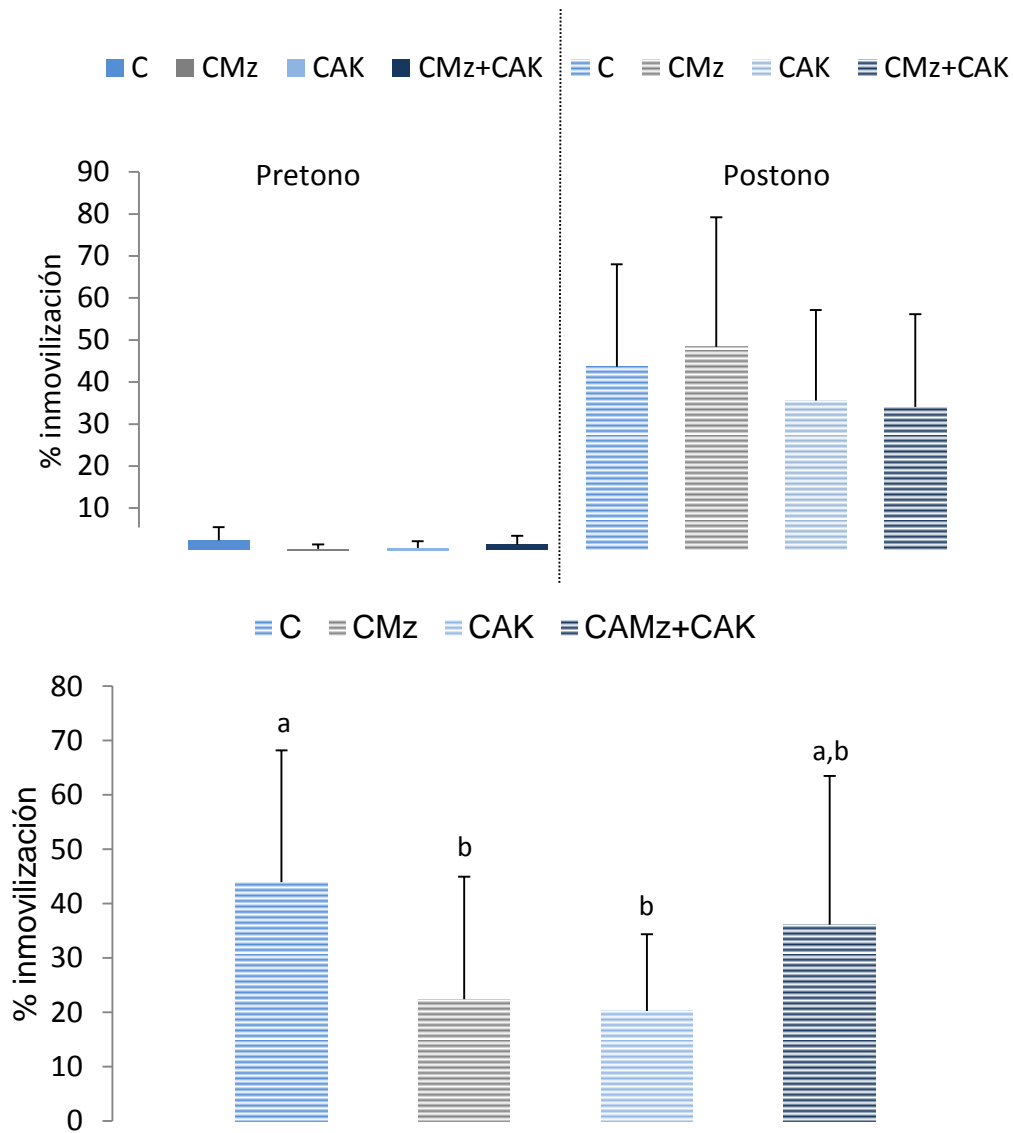


Figura 6.5a. (arriba). Porcentaje de inmovilización en el entrenamiento al condicionamiento del miedo y Figura 6.5b. (abajo) Porcentaje de inmovilización en la prueba de condicionamiento del miedo al contexto. Letras diferentes muestran diferencias significativas entre grupos.

El déficit de AGPICL n-3 en cerebro ha sido relacionado con la alteración en el estado cognitivo y desórdenes neuronales. En concreto, se ha sugerido una sinergia entre el estrés crónico temprano en roedores por la separación materna, y su relación con dietas deficitarias en AGPI n-3 (Mathieu *et al.*, 2011). Por otro lado, el estudio realizado por Cutuli *et al* (2014), en el que se suplementó a ratas de 19 meses con, EPA, DPA y DHA, respecto al grupo control, suplementado con el mismo aporte calórico en forma de aceite de oliva, mostró que la suplementación en los AGPICL n-3, adquiría una mayor memoria asociativa en la respuesta del condicionamiento del miedo al contexto, siendo similares los tiempos de bloqueo (*freezing*) en el entrenamiento previo. En el presente estudio, contradictoriamente, se obtuvieron

menores porcentajes de inmovilización con la suplementación de LP marinos (con AGPICL n-3), así como en el grupo suplementado con LP de Mz, sin embargo, en el grupo alimentado por CMz+CAK, no se obtuvieron diferencias significativas respecto al grupo control, lo que podría llevar a considerar posibles sinergias entre el CMz y CAK en la dieta, como ya se observó en el capítulo V respecto a la modificación del perfil lipídico de los animales suplementados del grupo CMz+CAK.

Por otro lado, cabe mencionar que son pocos los estudios presentes en la literatura actual, que evalúen la suplementación de LP y su relación con la respuesta al miedo vinculada a la memoria asociativa.

5. CONCLUSIONES PARCIALES

En el desarrollo del estudio del nivel cognitivo de los animales suplementados, se mostró una menor respuesta de la memoria emocional cuando se consumieron LP de Mz y AK por separado, pero no en el consumo de manera conjunta. Sin embargo, no se mostraron diferencias en el estado de la memoria espacial, ni en el estado de ansiedad en las restantes pruebas a las que fueron sometidos los animales, respecto al grupo control (aceite de oliva). Por otro lado, aunque en la literatura revisada ha sido comprobado el mayor deterioro cognitivo en ratas cuando su dieta es deficitaria en compuestos como los AG n-3, la falta de resultados concluyentes en el presente estudio, no ha podido confirmar este efecto. Por ello, se considera necesario abordar nuevos enfoques en la investigación, entre los que se encuentran la evaluación de la dosis diaria aportada en la suplementación de los animales, así como el estudio del efecto del consumo de los suplementos enriquecidos en lípidos polares, respecto al efecto del aporte de dietas controles que posean restricciones más estrictas en los compuestos lipídicos de estudio.

7. RESUMEN

CAPÍTULO VII. RESUMEN

Los lípidos son moléculas de gran importancia a nivel metabólico, ya que cumplen numerosas funciones biológicas imprescindibles en el organismo, entre ellas, actúan como reserva energética (en el caso de los triglicéridos), función estructural (los fosfolípidos, esfingolípidos y colesterol que conforman las membranas celulares), función reguladora y señalizadora (como hormonas esteroideas, eicosanoides, etc), y transportadora (como ácidos biliares). Además, durante las últimas décadas se han logrado avances científicos notables en nuestra comprensión de cómo los lípidos de la dieta influyen en la salud, lo que ha conducido a diferenciar los aceites y grasas alimentarias y la composición en clases de lípidos y ácidos grasos de los diferentes alimentos, y los posibles efectos beneficiosos o perjudiciales en la salud, más allá de las funciones metabólicas que desempeñan en el organismo.

En esta Tesis, se presta especial atención a los lípidos polares (LP), que como ya se ha indicado, se encuentran ampliamente distribuidos en todos los tejidos animales y vegetales, son caracterizados por su función estructural, ya que conforman la base principal de las membranas celulares. Además, son moléculas de señalización celular (o precursores de éstas), forman parte de la bilis, y están implicados en el anclaje de proteínas a la membrana plasmática.

Aparte de las rutas metabólicas de síntesis endógena de lípidos polares, existe una amplia variedad de alimentos de nuestra dieta que aportan diferentes tipos y cantidades de lípidos polares. En particular, entre los alimentos destacados por su contenido en lípidos polares, se encuentran los huevos, vísceras y carnes, pescado y crustáceos, cereales, semillas oleaginosas, leche y derivados lácteos. La composición de cada grupo de alimentos mencionado, varía en diferentes proporciones de fosfo- y esfingolípidos. En este contexto, la leche y los productos lácteos, aunque cuentan con un contenido bajo en lípidos polares (0.2-1g lípidos polares/100 g grasa), en su composición existe una amplia variedad, encontrando los fosfolípidos fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina y fosfatidilinositol, y el esfingolípido esfingomielina. Existen derivados lácteos que mantienen la misma distribución en lípidos polares que en la leche, pero en mayor concentración. Un buen ejemplo de ello es la mazada, subproducto acuoso de la elaboración de mantequilla. Posee un

contenido en grasa entre 5-10% (peso seco), que se compone de lípidos polares en un rango entre 5-30%, lo que le hace una fuente potencial de lípidos polares de la dieta.

Por otro lado, una importante fuente de lípidos polares marinos es el aceite de krill. El krill es un crustáceo de pequeño tamaño que se encuentra principalmente en el océano Antártico. Se trata del mayor representante de la biomasa del zooplancton antártico. El hecho que lo hace interesante desde el punto de vista nutricional, es que en su composición lipídica cuenta con un importante contenido en lípidos polares (aproximadamente 50% de fosfolípidos respecto al contenido graso total). Esto lo diferencia de otros aceites marinos, como el aceite de pescado que contiene triglicéridos mayoritariamente en su composición lipídica. Estudios recientes han reportado una mejor absorción y biodisponibilidad de los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, como EPA y DHA, con numerosas funciones y efectos beneficiosos principalmente en el sistema nervioso, cuando están esterificados en los fosfo- y esfingolípidos, que cuando se encuentran unidos a triglicéridos.

El consumo de una dieta rica en LP ha sido ampliamente relacionado con la prevención y mejora de enfermedades de diversa índole, como cardiovasculares, procesos cancerígenos, enfermedades hepáticas, respuesta inmunitaria, actividad cognitiva, etc.

El sistema nervioso, después del tejido adiposo, es el segundo órgano con mayor concentración en lípidos, y se ha reportado que una alteración en su regulación puede desencadenar procesos relacionados con isquemia cerebral, esquizofrenia, bipolaridad, o enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer. En este contexto, actualmente existe una amplia literatura que relaciona la suplementación de ácidos grasos n-3 como EPA y DHA con la prevención y mejora de procesos como la pérdida de memoria y retraso en la aparición del deterioro cognitivo leve en edades tardías. Sin embargo, la alteración de LP presentes en tejidos nerviosos, como la disminución de fosfatidilserina, o esfingomielina, se ha relacionado con procesos de deterioro cognitivo, aunque los estudios son todavía escasos y los resultados contradictorios.

En base a estos antecedentes, el objetivo general de la presente Tesis Doctoral ha sido:

- La evaluación del efecto de la suplementación de lípidos polares de origen lácteo y marino en la prevención del deterioro cognitivo leve asociado al envejecimiento, mediante un estudio preclínico en ratas de edad avanzada.

Para la consecución de dicho objetivo general, se plantearon los siguientes objetivos parciales:

5. Obtención de complementos nutricionales ricos en lípidos polares a partir de concentrados de fosfolípidos obtenidos de mazada láctea y aceite de krill.
6. Determinación de la biodisponibilidad oral de los complementos enriquecidos en lípidos polares de mazada láctea y aceite de krill.
7. Estudio preclínico del efecto de la suplementación en la dieta del complemento nutricional enriquecido en lípidos polares de mazada láctea y/o aceite de krill en distintos tejidos y regiones cerebrales de ratas de edad avanzada
8. Evolución del perfil conductual y de la capacidad cognitiva de ratas de edad avanzada tras el consumo del complemento nutricional enriquecido en lípidos polares de mazada láctea y/o aceite de krill.

Para la obtención del producto enriquecido en lípidos polares lácteos, fue necesario optimizar un método de extracción de grasa de mazada, que se llevó a cabo mediante tecnología de líquidos presurizados (PLE) con el empleo de disolventes de grado alimentario, como etanol. Basándonos en estudios previos de nuestro grupo, se logró desarrollar un procedimiento para obtener la extracción completa de la fracción lipídica de mazada.

Posteriormente, para enriquecer la fracción de lípidos polares de mazada, se empleó una técnica basada en la baja solubilidad de esta fracción en acetona como disolvente de grado alimentario. La separación de la fracción lipídica soluble en acetona (triglicéridos), de la fracción insoluble en acetona (lípidos polares), se obtuvo con la aplicación de una relación 1:5 (grasa de mazada/acetona), y la posterior resuspensión de la fracción insoluble a una relación 1:2 (precipitado de grasa de mazada/acetona), consiguiendo un producto final con un contenido aproximado del 85% en lípidos polares de mazada.

Por otro lado, para llevar a cabo el enriquecimiento de LP del aceite de krill, se desarrolló un proceso de fraccionamiento en frío, basado en la solubilidad de los componentes lipídicos en etanol a bajas temperaturas. La optimización y posterior escalado del proceso se realizó mediante el ensayo a diferentes tiempos (24h y 48h) y temperaturas (20 °C, 4 °C, -20 °C y -35°C). La fracción más polar del aceite de krill (diglicéridos y fosfolípidos) se solubilizó en etanol, mientras que la fracción más apolar (triglicéridos), formó un precipitado de menor solubilidad en este disolvente. A la

temperatura más baja empleada (-35°C) se obtuvo el mayor porcentaje de lípidos polares de aceite de krill en la fracción soluble. Así, se consiguió un producto final con una elevada composición en diglicéridos y lípidos polares (~70%), donde se encontraban preferentemente los ácidos grasos EPA y DHA.

En base a los resultados obtenidos, se logró la obtención de productos enriquecidos en lípidos polares de mazada y krill, mediante el empleo de tecnología verde y disolventes de grado alimentario, de una manera sencilla, económica y fácilmente escalable, para su posterior uso como complemento nutricional potencialmente funcional.

Posteriormente se consideró de gran interés llevar a cabo un estudio piloto en animales de experimentación, para determinar la biodisponibilidad de los distintos productos enriquecidos en LP, y obtener un mayor conocimiento de la presencia y farmacocinética de los compuestos lipídicos en plasma, así como establecer posibles diferencias que puedan producirse por el efecto de la matriz y composición de cada uno de los concentrados enriquecidos.

Para ello, se administró una dosis única del concentrado en LP a ratas que posteriormente fueron sacrificadas a 0h, 30min, 1h, 4h y 8h tras la ingesta del producto, con el fin de llevar a cabo el análisis de la composición lipídica del plasma a los tiempos mencionados.

Los resultados obtenidos indicaron que las clases lipídicas y ácidos grasos plasmáticos de los animales variaba en función de la composición lipídica de los concentrados enriquecidos en LP de mazada y krill. Así, con la administración del concentrado de mazada se observó un incremento en la concentración de triglicéridos en plasma a partir de 1h tras la ingesta, relacionada con una disminución proporcional de ésteres de colesterol (EC). En esta relación inversa parece estar directamente involucrada la proteína de transferencia de éster de colesterol, que realiza la transferencia de TG y EC entre lipoproteínas. Concretamente, media en el intercambio de EC de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) y TG de las lipoproteínas de baja densidad (VLDL y LDL). Así, se ha reportado que el aumento postprandial de TG plasmáticos, está directamente relacionado con el aumento de la actividad de esta enzima. Por otra parte, cuando se les administró el concentrado de LP de krill, no se observaron diferencias significativas en el contenido de TG a lo largo del tiempo de estudio, hecho que parece estar relacionado con el metabolismo de EPA y DHA y su efecto en la regulación de los TG plasmáticos. Las clases lipídicas que incrementaron su contenido en plasma tras el consumo del concentrado de LP de krill, fueron

monoglicéridos y fosfolípidos (principalmente fosfatidilcolina), tras 8h de la ingesta. Este lento incremento de monoglicéridos, podría estar relacionado con la actividad de la lipoprotein lipasa, encargada de hidrolizar triglicéridos a ácidos grasos en los quilomicrones, para que sean absorbidos por los tejidos, por lo que, en la actividad de la enzima, se incrementa la concentración de di-monoglicéridos, hasta obtener los ácidos grasos libres disponibles para las células de los tejidos de destino. Por otro lado, el incremento de fosfatidilcolina a partir de 8h tras la ingesta del concentrado de krill, se explicaría por una absorción más lenta respecto a los triglicéridos, resultados que han sido previamente descritos también por otros autores.

En cuanto a la biodisponibilidad de los ácidos grasos, el C14 y C18:1 mostraron un incremento en plasma a partir de 30min tras la ingesta, así como de ácido linoleico conjugado (ácido graso característico de productos lácteos) en los animales a los que se les administró concentrado de LP de mazada. Por otro lado, los ácidos grasos mayoritarios del concentrado enriquecido en LP de krill, C14, C16:1, C18:1 *cis*, EPA y DHA, mostraron un incremento en plasma a partir de 1h tras el consumo.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, posteriormente se realizó el estudio preclínico del efecto de la suplementación en la dieta del complemento nutricional enriquecido en lípidos polares lácteos y marinos, en distintos tejidos y regiones cerebrales de ratas de edad avanzada y el posible efecto en su actividad conductual y cognitiva.

Los complementos nutricionales suplementados a la dieta fueron elaborados teniendo en cuenta las recomendaciones de ingesta de fosfatidilserina, esfingomielina y de los ácidos grasos EPA y DHA, y extrapolados al peso de los animales, en forma de monodosis diarias durante 3 meses. Un total de 46 animales fueron distribuidos aleatoriamente en 4 grupos: 1) control (suplementado con aceite de oliva, 70mg/día), 2) suplementado en lípidos polares lácteos (70mg/día), 3) suplementado en lípidos polares marinos (70mg/día) y 4) suplementado en lípidos polares lácteos y marinos de forma conjunta (140mg/día). Por otro lado, todos los animales se alimentaron con una dieta compuesta por el mismo pienso, que fue previamente analizado y se seleccionó por tener un bajo contenido en lípidos polares y ácidos grasos EPA y DHA, respecto a otros piensos analizados.

Transcurrido el tiempo de consumo diario de los complementos y las pruebas de comportamiento posteriores que relacionasen el estado cognitivo de los animales con el consumo de cada dieta, se llevó a cabo el sacrificio de los animales para la obtención de los tejidos: regiones cerebrales (cortezas frontal, temporal y occipital,

hipocampo y cerebelo), tejido adiposo visceral y superficial, hígado y sangre (eritrocitos y plasma).

Los resultados obtenidos indican que la suplementación nutricional de los productos enriquecidos en LP de mazada y/o krill, produjo la modificación del perfil lipídico en los tejidos de los animales del estudio, respecto a los animales control (suplementados con aceite de oliva) que se detalla a continuación. En el perfil lipídico de los eritrocitos, la suplementación de la dieta no provocó cambios significativos en las clases lipídicas. Sin embargo, en plasma se observó una disminución de fosfatidilcolina en el grupo suplementado de aceite de krill, y en el grupo suplementado con la mezcla de LP. Por otro lado, en el contenido en ácidos grasos de eritrocitos se observó la disminución del ácido graso C20:1 n-6 en todos los animales suplementados con LP respecto al grupo control. Este mismo efecto se observó en el contenido de C18:3 n-6 de plasma, que también fue menor en el perfil de los grupos suplementados con LP.

Respecto al perfil lipídico obtenido en los tejidos adiposos (visceral y superficial), también se produjo la disminución de C18:3 n-6 con la suplementación de LP. Además, sólo cuando la suplementación de LP de mazada y krill era conjunta, se observó un incremento en tejido adiposo superficial de EPA, DPA y DHA (ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga n-3). El comportamiento sinérgico de los LP de mazada y krill, también se observó en hígado, al provocar la disminución del ácido linoleico (C18:2 n-6), así como del total de ácidos grasos n-6.

Las regiones cerebrales analizadas: corteza frontal, temporal y occipital (CF, CT, CO), así como hipocampo (HP) y cerebelo (CB), se investigaron por su implicación en tareas de memoria y procesos cognitivos como son las funciones de ejecución, atención y memoria, y otras funciones relacionadas con los comportamientos conductuales.

En el análisis de clases lipídicas de los tejidos cerebrales, tras la obtención de los extractos lipídicos, se cuantificaron dos compuestos que se identificaron como el gangliósido Neu-Ac α 2-3-Gal β -Cer d18:1/26:0 y la ceramida LacCer d18:1/18:1 mediante el empleo de un equipo UPLC-QToF-MS.

En la CT se observó un incremento de gangliósidos en el grupo suplementado con LP de krill y en el grupo de mazada y krill de manera conjunta al igual que en CO. En este punto, cabe mencionar que los gangliósidos, son glucolípidos que se encuentran en elevadas concentraciones en las células del sistema nervioso y juegan un importante papel en la actividad neuronal. En numerosas investigaciones realizadas en cultivos

celulares, ha sido reportado un efecto de expansión de las neuronas, así como una mayor supervivencia frente a moléculas tóxicas al incrementar de manera externa el contenido de gangliósidos. Aunque los mecanismos moleculares no son del todo conocidos, ha sido posible comprobar que la suplementación de la dieta de los animales con LP lácteos y marinos, provoca un incremento significativo de los niveles de gangliósidos tanto en los tejidos de CT y CO.

Respecto a la composición en ácidos grasos de las cortezas cerebrales, disminuyó el contenido en dimetilacetales (DMA) en el grupo suplementado con los LP de manera conjunta. Los DMA son productos de la metilación de plasmalógenos, y han sido descritos como componentes estructurales de las membranas celulares, encontrándose en importantes cantidades en tejido nervioso (aproximadamente el 7% de los LP). Además, se le atribuyen otro tipo de funciones, entre otras, se proponen como un reservorio de AGPI para mantener niveles elevados de estos AG en determinados tejidos. En este punto, cabe mencionar la existencia de estudios que vinculan niveles bajos de plasmalógenos en cerebro de pacientes con enfermedades neurodegenerativas. No obstante, el menor nivel de plasmalógenos se encuentra relacionado con un menor nivel de DHA que no se observó en la presente investigación en ninguno de los tejidos analizados.

En cuanto a la composición lipídica del HP, se observó cómo la suplementación de la dieta con LP de mazada y krill de manera conjunta, afectó al perfil de clases lipídicas mostrando una disminución en el contenido de ceramidas. Las ceramidas, por sí mismas, son moléculas de señalización asociadas habitualmente a procesos de apoptosis. En este contexto, ha sido reportada la vinculación de una alteración en el metabolismo de los esfingolípidos, en la que se produce la acumulación de ceramidas en cerebro, y su relación con procesos neurodegenerativos al estar involucradas en un incremento de procesos de estrés oxidativo. En base a estos antecedentes, el menor contenido en ceramidas observado en el grupo suplementado con LP de mazada y krill estaría relacionado con un estado menos proclive a procesos de estrés oxidativo y de apoptosis.

Finalmente, en el estudio de comportamiento y perfil cognitivo de los animales, tras los 3 meses de suplementación de LP lácteos y marinos, se llevaron a cabo pruebas conductuales que respondieran al estado de la memoria espacial, ansiedad y memoria emocional.

La memoria espacial y el estado de ansiedad de los grupos suplementados con LP no mostró diferencias significativas con el grupo control, sin embargo, la memoria emocional presentó una valoración inferior sólo en el caso de la suplementación de lípidos polares de mazada y krill cuando se suministraban de manera independiente, pero no cuando éstos se consumieron de manera conjunta, ratificando de nuevo el comportamiento sinérgico de LP lácteos y marinos.

A partir de los resultados de las investigaciones científicas realizadas en este estudio, se puede concluir que la ingesta de complementos nutricionales ricos en fosfo- y esfingolípidos de origen lácteo y marino de manera conjunta, establecen una sinergia que, en el marco de una dieta equilibrada, pueden considerarse como una medida potencialmente preventiva del deterioro cognitivo leve en animales de edad avanzada. No obstante, los resultados de este estudio se pueden considerar un primer paso para trabajos futuros en los que se podrían proponer nuevas dosis, distintas de las recomendaciones nutricionales, que se consideren idóneas del consumo de lípidos funcionales ya sea de forma aislada o integrados en su matriz original (como es el caso de la membrana grasa del glóbulo lácteo) y sus niveles adecuados de ingesta diaria.

8. CONCLUSIONES GENERALES

CAPÍTULO VIII. CONCLUSIONES GENERALES

Los resultados obtenidos durante el desarrollo de los diferentes capítulos que conforman la presente Tesis Doctoral han permitido extraer las siguientes conclusiones generales:

1. Se ha logrado obtener la extracción completa de la fracción lipídica de mazada mediante la optimización de un procedimiento basado en el empleo de fluidos presurizados y etanol como disolvente de grado alimentario.
2. Se han desarrollado dos métodos de enriquecimiento en lípidos polares (LP) tanto de grasa de mazada como de aceite de krill, mediante su fraccionamiento con disolventes de grado alimentario (acetona y etanol, respectivamente). El procedimiento desarrollado es sencillo, económico y fácilmente escalable, lo que permite la obtención de concentrados de elevada pureza en fosfo- y esfingolípidos lácteos, así como de concentrados de aceite de krill ricos en EPA y DHA.
3. La biodisponibilidad de las clases lipídicas de los concentrados en lípidos polares, valorada mediante la ingesta de una dosis única en ratas, muestra diferentes patrones de absorción en función de la composición de cada concentrado. Así, el consumo del concentrado de lípidos polares de mazada provoca un incremento de triglicéridos en plasma tras 1h de su ingesta, mientras que el consumo del concentrado en lípidos polares de aceite de krill, muestra un lento incremento de los niveles postprandiales de fosfatidilcolina, que se mantiene 8h tras la ingesta.
4. La biodisponibilidad en plasma de los ácidos grasos mayoritarios del concentrado en LP de mazada, C14:0, C16:1, C18:1 n9 y del ácido linoleico conjugado, se produce a partir de los 30 minutos de la ingesta. Sin embargo, la velocidad de absorción de los ácidos grasos mayoritarios del concentrado en lípidos polares de aceite de krill, C14:0, C16:1, C18:1, EPA y DHA se produce a partir de la primera hora postprandial.

5. La suplementación de LP lácteos y marinos durante tres meses en la dieta de ratas de edad avanzada, no provoca cambios significativos en las clases lipídicas de los eritrocitos. Sin embargo, el contenido plasmático de EPA se incrementa mientras que el ácido araquidónico y la fosfatidilcolina disminuyen en el grupo suplementado con LP de aceite de krill y en el grupo suplementado con la mezcla de LP lácteos y marinos.
6. El consumo de suplementos enriquecidos en LP de mazada y krill de manera conjunta, genera un efecto sinérgico en la mejora del perfil lipídico del tejido adiposo superficial, con el incremento de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (EPA, DPA y DHA), y del hígado, con la disminución del contenido de C18:2 (n-6).
7. La suplementación de la dieta de manera conjunta con LP lácteos y marinos, ejerce un efecto sinérgico en la mejora del perfil lipídico de las distintas regiones cerebrales estudiadas, reflejado en una disminución del contenido en ceramidas del hipocampo, así como en el incremento de gangliósidos en las cortezas cerebrales. Todo ello se relaciona con un estado neuronal potencialmente menos propenso al deterioro cognitivo.
8. La memoria espacial y el estado de ansiedad de los animales suplementados con los concentrados de LP, no mostró diferencias significativas con el grupo control, sin embargo, la memoria emocional presentó una valoración inferior sólo en el caso de la suplementación con LP de mazada y krill de manera independiente, pero no cuando éstos se consumieron de manera conjunta, confirmando de nuevo el comportamiento sinérgico de LP lácteos y marinos.
9. En general, el consumo de complementos nutricionales ricos en fosfo- y esfingolípidos de origen lácteo y marino de manera conjunta, produce una sinergia que, en el marco de una dieta equilibrada, puede considerarse como una medida potencialmente preventiva del deterioro cognitivo leve en animales de edad avanzada. No obstante, los resultados de este estudio suponen un primer paso para el desarrollo de trabajos futuros, en los que se podrían proponer nuevas dosis de ingesta de lípidos funcionales, distintas de las indicadas en las recomendaciones nutricionales, ya sea de forma aislada o integrados en su matriz original, como es el caso de la membrana del glóbulo lácteo y el aceite de krill.

BIBLIOGRAFÍA

Adibhatla R.M., Hatcher J.F., Dempsey R.J. (2006) Lipids and lipidomics in brain injury and diseases. *The AAPS Journal* 8 (2) 36.

Agren J.J., Hallikainen M., Vidgren H., Miettinen T. A., Gylling H. (2006) Postprandial lipemic response and lipoprotein composition in subjects with low or high cholesterol absorption efficiency. *Clinica Chimica Acta* 366 309-315.

Akoh C.C. y Min D.B. (2008) Food lipids: Chemistry, nutrition and biotechnology. CRC Press QP751.F647

Alsema M., Dekker JM., Heine RJ. (2007) Elevated cholesteryl ester transfer protein concentration associated with an increased risk for cardiovascular disease in women, but not in men, with type 2 diabetes: the hoorn study. *Diabetic Medicine* 24 (2) 117-123.

Alves E., Melo T., Rey F., Moreira A., Domingues P., Dominges M.R., (2016) Polar lipid profiling of olive oils as a useful tool in helping to decipher their unique fingerprint. *LWT- Food Science and Technology* 74 371-377.

Aoum M., Fournet G., Michel F., Bonafos B., Ramos J., Cristol J-P., Carbonneau M-A., Coudray C., Feillet-Coudray C. (2012) Dietary fatty acids modulate liver mitochondrial cardiolipin content and its fatty acid composition in rats with nonalcoholic fatty liver disease. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 44 439-452.

Arab (2003) Biomarkers of fat and fatty acid intake. *The Journal of Nutrition* 925S-932S.

Araujo J.A., Landsberg G.M., Milgram N.W, Miolo A (2008) Improvement of short-term memory performance in aged beagles by a nutraceutical supplement containing phosphatidylserine, Ginkgo biloba, vitamin E, and pyridoxine. *Canadian Veterinary Journal*. 49 (4) 379-85.

Araujo P., Zhu H., Breivik J., Hjelle J., Zeng Y. (2014). Determination, structural elucidation of triacylglycerols in krill oil by chromatographic techniques. *Lipids* 49, 163-172.

Aro H., Järvenpää E. P., Könkö K., Sihvonen M., Hietaniemi V., Huopalahti R. (2009) Isolation, purification of egg yolk phospholipids using liquid extraction, pilot-scale supercritical fluid techniques. *Euro Food Research Technology* 228, 857-863.

Arouri A., Mouritsen O.G. (2013) Membrane-perturbing effect of fatty acids and lysolipids. *Progress in Lipid Research* 52 130-140

Astarita G. y Piomelli D., (2010) Towards a whole-body systems (multi-organ) lipidomics in Alzheimer's disease. *Prostaglandins, Leucotrienes and Essential Fatty Acids*. 85 197-203.

Aureli M., Loberto N., Chigorno V., Prinetti A., Sonnino S. (2011) Remodeling of sphingolipids by plasma associated enzymes. *Neurochemical Research* 36 1636-1644.

Babenko N., Semenova Y. (2010). Effects of long-term fish oil.enriched diet on the sphingolipid metabolism in brain of old rats. *Experimental Gerontology* 45 375-380.

Baylin A., Kabagambe E., Siles X., Campos H. (2002) Adipose tissue biomarkers of fatty acid intake. *The American Journal of Clinical Nutrition* 76 750-757.

Belayev L., Khourtorova L, Atkins K., Eady T., HongS., Lu Y., Obenaus A., Bazan N (2010) Docosahexaenoic acid therapy of experimental ischemic stroke. *Translational Stroke Research* 2: 33-41

Bellanger N., Julua Z., Villard E., El Khoury P., Duchene E., Chapman MJ., Fournier N., Le Goff W., Guerin M (2012) Functionality of postprandial larger HDL2 particles is enhanced following CETP inhibition therapy. *Atherosclerosis* 221 160-168.

Benkalfat N., Merzouk H., Bouanane S., Merzouk S-A., Bellenger J., Gresti J., Tessier C., Narce M. (2011) Altered adipose tissue metabolism in offspring of dietary obese rat dams. *Clinical Science* 121 19-28.

Berge K., Musa-Veloso K., Harwood M., Hoem N., Burri L. (2014) Krill oil supplementation lowers serum triglycerides without increasing low-density lipoprotein cholesterol in adults with borderline high or high triglyceride levels. *Nutrition Research* 34 126-133.

Berra B., Colombo E., Sottocomola A. (2002) Dietary sphingolipids in colorectal cancer prevention. *European Journal of Cancer Prevention* 11 193-197

Bockish M. (1998) *Fats and oils handbook*. ISBN 0-9-35315-82-9

Boskou D., Blekas G., Tsimidou M (2006). *Olive Oil: Chemistry and Technology*. Chapter 4: Olive oil composition. American Oil Chemists' Society ISBN: 978-1-893997-88-2.

Bradbury M. (2006) Lipid metabolism and liver inflammation. Hepatic fatty acid uptake: posible role in steatosis. American Physiological Society 290: G194-G198.

Bradley M., Markesbery W., Lovell M. (2010) Increased levels of 4-hydroxynomenal and acrolein in the brain in preclinical Alzheimer disease. Free Radical Biology and Medicine 48 1570-1576.

Buang Y., Wang Y.M., Cha J. Y., Nagao K., Yanagita T. (2005) Dietary phosphatidylcholine alleviates fatty liver induced by orotic acid. Nutrition 21 867-873.

Buckner R. (2013) The cerebellum and cognitive function: 25 years of insight from anatomy and neuroimaging. Neuron 80 807-815.

Bunea R., El Farrah K., Deutsch L. (2004). Evaluation of the effects of Neptune Krill Oil on the clinical course of hyperlipidemia. Altern. Med. Rev.: Journal Clininal Therapeutics 9 420-428.

Burling H., Graverholt G. (2008) Milk- a new source for bioactive phospholipids for use in food formulations. Lipid Technology 20, 10, 229-231.

Burr M.L., Fehily A.M., Gilbert J.F., Rogers S., Holliday R.M., Sweetnam P.M., Elwood P.C., Deadman N.M. (1989) Effect of changes in fat, fish and fibre intakes on death and myocardial reinfarction: diet and reinfarction trial (DART). Lancet 2 757-761.

Burri L., Berge K., Wibrand K., Berge R., Barger J. (2011) Differential effects of krill oil and fish oil on the hepatic transcriptome in mice. Frontiers in Genetics doi: 103389/fgene.2011.00045.

Burri L., Berge Kjetil (2013) Recent findings on cardiovascular and mental health effects of krill oil and omega-3 phospholipids. Nutrition and Health 179-191.

Burri L., Hoem N., Banni S., Berge Kjetil (2012) Marine omega-3 phospholipids: metabolism and biological activities. International Jounral of Molecular Sciences 13 15401-15419.

Cabezas D.M., Diehl B., Tomás M.C. (2009). Effect of processing parameters on sunflower phosphatidylcholine-enriched fractions extracted with aqueous ethanol. European Lipid Science Technology (111) 993-1002

Calvo M.V., Castro-Gómez P., Fontecha F.J., García-Serrano A.M., Juárez M., Rodríguez Alcalá LM (2014) Grasa láctea como fuente natural de compuestos bioactivos. *Alimentación, Nutrición y Salud* 21(3) 57-63

Camand E, Morel MP, Faissner A, Sotelo C, Dusart I. (2004) Long-term changes in the molecular composition of the glial scar and progressive increase of serotonergic fibre sprouting after hemisection of the mouse spinal cord. *European Journal of Neuroscience* 20: 1161–1176.

Cancello, R., Tordjman, J., Poitou, C., Guilhem, G., Bouillot, J., Hugol, D., Coussieu, C., Basdevant, A., Bar Hen, A., Bedossa, P., Guerre-Millo, M. & Clement, K. (2006). Increased infiltration of macrophages in omental adipose tissue is associated with marked hepatic lesions in morbid human obesity. *Diabetes* 55, 1554–1561.

Carabias-Martínez R., Rodríguez-Gonzalo E., Revilla-Ruiz P., Hernández-Méndez J. (2005) Pressurized liquid extraction in the analysis of food, biological samples. *Journal of Chromatography A* (1089) 1-17.

Castro-Gómez M. P., Fontecha J., Rodríguez-Alcalá L. M. (2014b) A high-performance direct transmethylation method for total fatty acids assessment in biological, foodstuff samples. *Talanta*, 128, 518-523.

Castro-Gómez M. P., Holgado M. P., Rodríguez- Alcalá L. M., Montero O., Fontecha J. (2015) Comprehensive study of the lipid classes of krill oil by fractionation, identification of triacylglycerols, diacylglycerols, phospholipid molecular species by using UPLC/QToF-MS. *Food Analytical Methods* DOI 10.1007/s12161-0150150-6.

Castro-Gómez M.P., Rodríguez Alcalá L.M., Calvo M.V., Romero J., Mendiola J.A., Ibáñez E., Fontecha J. (2014) Total milk fat extraction, quantification of polar, neutral lipids of cow, goat, ewe milk using a pressurized liquid, chromatographic techniques. *Journal Dairy Science* (97) 6719-6728.

Castro-Gomez MP, Rodriguez-Alcala LM, Monteiro KM., Ruiz AL., Carvalho JE., Fontecha J (2016) Antiproliferative activity of buttermilk lipid fractions insolated using food grade and non-food grade solvents on human cancer cell lines. *Food Chemistry* 212: 695-702.

Castro-Gómez P., García-Serrano A., Visioli F. and Fontecha J. (2015a) Relevance of dietary glycerophospholipids and sphingolipids o human health. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. 101 41-51

Catchpole O.J., Tallon S.J., Eltringham W.E., Grey J.B., Fenton K.A., Vagi E.M., Vyssotski M.V., Mackenzie A.N., Ryan J., Zhu Y. (2009) The extraction, fractionation of specialty lipids using near critical fluids. *The Journal of Supercritical Fluids* (47) 591-597.

Cawood A., Ding R., Napper F., Young R., Williams J., Ward M., Gudmundsen O., Vige R., Payne S., Ye S., Shearman C., Gallager P., Grimble R., Calder P (2010) Eicosapentaenoic acid from highly concentrated n-3 fatty acid ethyl esters is incorporated into advanced atherosclerotic plaques and higher plaque EPA is associated with decreased plaque inflammation and increase stability. *Atherosclerosis* 212 252-259

Cha J., Cho Y., Kim I., Anno T., Rahman S., Yanagita T. (2001) Effect of hesperetin, a citrus flavonoid, on the liver triacylglycerol content and phosphatide phosphohydrolase activity in orotic acid-fed rats. *Plants Foods for Human Nutrition* 56 349-358.

Changi S., Matzger A., Savage P. (2012) Kinetics and pathways for an algal phospholipid (1,2-dioleoyl-sn-glycerol-3-phosphocoline) in high-temperature (175-350°C) water. *Green Chemistry* 14 2856.

Chavko M., Nemoto E., Melick J (1993) Regional lipid composition in the rat brain. *Molecular and Chemical Neuropathology*, 18 123-131.

Chayer C y Freedman M. (2001) Frontal lobe functions, *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 547-552.

Chen H-F y Su H-M (2012) Fish oil supplementation of maternal rats on an n-3 fatty acid-deficient diet prevents depletion of maternal brain regional docosahexaenoic acid levels and has a postpartum anxiolytic effect. *Journal of Nutritional Biochemistry* 23 299-305.

Chhetry B. T., Hezghia A., Miller J. M., Lee S., Rubin-Falcone H., Cooper T. B., Oquendo M., Mann J. J., Sublette M. E. (2016) Omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation and White matter changes in major depression. *Journal of Psychiatric Research* 75 65-74.

Chow C.K. (2007) Fatty acids in foods and their health implication. CRC Press OP751.L547

Cohn J., Kamili A., Wat E., Chung R. W. S, Tandy S. (2010) Dietary Phospholipids and Intestinal Cholesterol Absorption. *Nutrients*, 116-127.

Colina-Coca C., Rodríguez-Alcalá L., Fontecha J., González-Peña D., de Ancos B., Sánchez-Moreno C. (2014) Effects of hypercholesterolemic diet enriched with onion as functional ingredient on fatty acid metabolism in Wistar rats. *Food Research International* 64 546-552.

Colsh B., Woods A. (2010) Localization and imaging of sialylated glycosphingolipids in brain tissue sections by MALDI mass spectrometry. *Glycobiology* 20 (6) 661-667.

Contarini G., Povo M. (2013). Phospholipids in Milk Fat: Composition, Biological and Technological Significance, and Analytical Strategies. *International Journal of Molecular Sciences* 14, 2808-2831

Conway V., Couture P., Richard C., Gauthier S.F., Pouliot Y., Lamarche B. (2013) Impact of buttermilk consumption on plasma lipids and surrogate markers of cholesterol homeostasis in men and women. *Nutrition., Metabolism and Cardiovascular. Dis.* 23 1255–1262.

Conway V., Gauthier S.F. Pouliot Y. (2014) Buttermilk: much more than a source of milk phospholipids. Doi: 10.2527/af.2014-0014.

Conway V., Gauthier S.F., Pouliot Y. (2010). Effect of cream pasteurization, microfiltration and enzymatic proteolysis on in vitro cholesterol-lowering activity of buttermilk solids. *Dairy Science and Technology*. 90 449-460.

Cossio-Bolaños M., Gómez- Campos R., Vargas Vitoria R., Hochmuller Fogaça, de Arruda M. (2013) Curvas de referencia para valorar el crecimiento físico de ratas macho Wistar. *Nutrición Hospitalaria* 28 (6) 2151-2156.

Costa M. R., Elias-Argote XE, Jiménez-Flores R, Gigante ML (2010). Use of ultrafiltration, supercritical fluid extraction to obtain a whey buttermilk powder enriched in milk fat globule membrane phospholipids. *International Dairy Journal*, 20(9), 598-602.

Coudelo L., Vaysse C., Vaïque E., Guy A., Gosse I., Durand T., Pinet S., Cansell M., Combe N. (2011) The fraction of alpha-linolenic acid present in the sn-2 position of structured triacylglycerols decreases in lymph chylomicrons and plasma

triacylglycerols during the course of lipid absorption in rats. The Journal of Nutrition <http://jn.nutrition.org/content/suppl/2011/12/21/jn.111.146290.DC1.html>

Cristhie W., y Han X. (2010). Lipid Analysis. Isolation, separation and identification and lipidomic analysis. Chapter 1. ISBN: 9780955251245

Cutler R., Kelly J., Storie K., Pedersen W., Tammara A., Hatanpaa K., Troncoso J., Mattson M. (2004) Involvement of oxidative stress-induced abnormalities in ceramide and cholesterol metabolism in brain aging and Alzheimer's disease. Proceedings of the National Academy of Sciences 101 (7) 2070-2075.

Cutuli D., de Bartolo P., Caporali P., Laricchiuta D., Foti F., Ronci M., Rossi C., Neri C., Spalletta G., Caltagirone C., Farioli-Vecchioli S., Petrosini L. (2014) n-3 polyunsaturated fatty acids supplementation enhances hippocampal functionality in aged mice. Frontiers in Aging Neuroscience (6) 220 1-17.

Da Boilt M., Mastalurova I., Brazaite G., McGovern N., Thompson K., Gray S.R. (2015) The effect of krill oil supplementation on exercise performance and markers of immune function. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids doi: 101371/journal.pone.0139174.

Danthine S., Blecker C., Paquot M., Innocente N., Deroanne C. (2000). Progress in milk fat globule membrane research: A review. Lait 80 209-222

Das U. N. (2006). Essential fatty acids: biochemistry, physiology and pathology. Biotechnology Journal. 1 420-439.

Dawczynski C., Hackermeier U., Viehweger M., Stange R., Springer M., Jahreis G (2011) Incorporation of n-3 AGPI and gamma-linolenic acid in blood lipids and red blood cell lipids together with their influence in disease activity in patients with chronic inflammatory arthritis- a randomized controlled human intervention trial. Lipids in Health and Disease 10:130

Dawson G. (2015) Measuring brain lipids. Biochimica et Biophysica Acta 1851 1026-1039.

Delroisse J-M, Boulvin A-L, PArmentier I, Dauphin R. D., Vandenbol M., Portetelle D. (2006). Quantification of *Bifidobacterium* spp. In rat fecal samples by real-time PCR. Microbiological Research 163 663-670.

Demirbilek S., Karaman A., Gurunluoglu K., Tas E., Akin M., Aksoy R.T., Turkmen E., Edali M.N., Baykarabulut A. (2006). Polyenylphosphatidylcholine pretreatment protects rat liver from ischemia/reperfusion injury. *Official Journal of Japan Society Hepatology, Hepatology. Research.* 34 84-91.

Dewettinck, K., R. Rombaut, N. Thienpont, T.T. Le, K. Messens, y J. Van Camp. (2008). Nutritional and technological aspects of milk fat globule membrane material. *International Dairy Journal.* 18:436–457.

Di Marzo V., Griinari M., Carta G., Murru E., Ligresti A., Cordeddu L., Giordano E., Biosongo T., Collu M., Catetta B., Uda S., Berge K., Banni S. (2010) Dietary krill oil increases docosahexaenoic acid and reduces 2-arachidonoylglycerol but no N-acylethanolamine levels in the brain of obese Zucker rats. *International Dairy Journal* 20 231-235.

Dial E.J., Doyen J. R., Lichtenberger L.M. (2006). Phosphatidylcholine-associated nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDS) inhibit DNA synthesis and the growth of colon cancer cells in vitro. *Cancer Chemotherapy Pharmacology.* 57 295-300.

Duan R.D. (2005). Anticancer compounds and sphingolipid metabolism in the colon. *In vivo* 19 (1) 293-300.

Dueppen D. G., S. G. Zeller D. G., I. Diltz D. G., Driver R. H. (2008) Fractionation, winterization of lipids from oilseed, microbial sources. US 7419596 B2

El Bagir, Nabiela M., Aziza H., Hamed M (2006) Lipid composition of egg yolk and serum in laying hens fed diets containing black cumin (*Nigella sativa*). *International Journal of Poultry Science*, 574-548.

El Baky A., El Baz H., El Baroty F., Asker M., Ibrahim E (2014) Phospholipids of some marine macroalgae: Identification, antiviral, anticancer and antimicrobial bioactivities. *Der Pharma Chemica* 6 (5) 370-382

El-Ansary AK, Ben Bacha AG, Al-Ayadhi LY (2011) Impaired plasma phospholipids and relative amounts of essential polyunsaturated fatty acids in autistic patients from Saudi Arabia. *Lipids in Health and Disease* 10:63.

El-Loly, M. 2011. Composition, properties and nutritional aspects of milk fat globule membrane- a review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences* 61:7–32.

Enser M., Richardson R., Wood J., Gill B., Sheard P. (2000) Feeding linseed to increase the n-3 AGPI of pork: fatty acid composition of muscle, adipose tissue, liver and sausages. *Meat Science* 55 201-212.

Evers J.M., Haverkamp R.G., Holroyd S.E., Jameson G.B., Mackenzie D.S., McCarthy O.J (2008) Heterogeneity of milk fat globule membrane structure and composition as observed using fluorescence microscopy techniques. *International Dairy Journal* (18) 1081-1089

FAO Food and Nutrition. Fats and fatty acids in human nutrition: Report of an expert consultation. Paper N° 91 (2010).

Ferramosca A., Conte A., Berge K., De Nuccio F., Giudetti A.M., Zara V. (2012). A krill oil supplemented diet suppresses hepatic steatosis in high-fat fed rats. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 7 (6) e38797.

Fine E.J., Ionita C.C., Lohr L (2002) The history of the development of the cerebellar examination. *Semin Neurol* 22 4 375-84

Folch J., Lees M., Stanley GH (1957) A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 226 1 497-509.

Fong B.Y., Norris C.S., MacGibbon A.K. (2007). Protein and lipid composition of bovine milk-fat-globule membrane. *International Dairy Journal*. 275-288.

Fonteh A., Cipolla M., Chiang J., Arakaki X., Harrington M (2014) Human cerebrospinal fluid fatty acid levels differ between supernatant fluid and brain-derived nanoparticle fractions and are altered in Alzheimer's disease. *Public Library of Science* 9 (6) 1-14.

Fotuhi M., Mohassel P. y Yaffe K. (2009) Fish consumption, long-chain omega.3 fatty acids and risk of cognitive decline or Alzheimer disease: a complex association. *Nature Reviews Neurology* 5 140-152.

Frasch S.C., Bratton D.L. (2012) Emerging roles for lysophosphatidylserine in resolution of inflammation. *Progress in Lipid Research*

Fukunaga K., Hossain Z., Takahashi K (2008). Marine phosphatidylcholine suppresses 1,2-dimethylhydrazine-induced colon carcinogenesis in rats by inducing apoptosis. *Nutrition Research* 28 635-640

Fuller K.L., Kuhlenschmidt T.B., Kuhlenschmidt M.S., Jiménez-Flores R., Donovan S.M. (2013). Milk fat globule membrane isolated from buttermilk or whey cream and their lipid components inhibit infectivity of rotavirus in vitro. *Journal of Dairy Science*. 96 3488–3497.

Gealekman, O., Guseva, N., Hartigan, C., Apotheker, S., Gorgoglione, M., Gurav, K., Tran, K., Straubhaar, J., Nicoloro, S., Czech, M., Thompson, M., Perugini, R. & Corvera, S. (2011). Depot-specific differences and insufficient subcutaneous adipose tissue angiogenesis in human obesity. *Circulation* 123, 186–194.

German B., Dillard C. (2006). Composition, structure and absorption of milk lipids: a source of energy, fat-soluble nutrients and bioactive molecules. *Critic. Reviews in Food Sciences and Nutrition*. 46 57-92.

Ghasemifard S., Hermon K., Turchini G., Sinclair A (2015) Metabolic fate (absorption, beta-oxidation and deposition) of long-chain n-3 fatty acids is affected by sex and by the oil source (krill oil or fish oil) in the rat. *British Journal of Nutrition* 114 6484-692

Gładkowski W., Chojnacka A., Kielbowicz G., Trziszka T., Wawrzńczyk C. (2012) Isolation of pure phospholipid fraction from egg yolk. *JAOCS*, 89 179-182.

Guardiola, J., Codony, R., Rafecas, M., Boatella, J. (1995) Formación de derivados oxidados del colesterol en alimentos. *Grasas y Aceites* 46 202-212

Guiotto E.N., Cabezas D.M., Diehl C.W.K., Tomás M.C. (2013). Characterization, emulsifying properties of different sunflower phosphatidylcholine enriched fractions. *European Journal of Lipid Science* (115) 865-873

Gustavsson M., Hodgkinson S.C., Fong B., Norris C., Guan J., Krageloh C.U., Breier B.H., Davison M., McJarrow Paul, Vickers M.H. (2010) Maternal supplementation with complex milk lipid mixture during pregnancy and lactation alters neonatal brain lipid composition but lacks effect on cognitive function in rats. *Nutrition Research* 30 279-289.

Hajra A., Radin N. (1962) Biosynthesis of the cerebroside odd-numbered fatty acids. *Journal of Lipid Research* 3 (3) 327-332.

Hannun, Y. A. y Obeid, L. M. (2008) Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9, 139–150.

Hejazi L., Wong J., Cheng D., Proschogo N., Ebrahim D., Garner B., Don A. (2011) Mass and relative elution time profiling: two-dimensional analysis of sphingolipids in Alzheimer's disease brains. *Biochemistry Journal* 438 165-175.

Hellhammer J., Waladkhani A-R, Hero T., Buss C. (2010). Effects of milk phospholipid on memory and psychological stress response. *British Food Journal*. 112 1124-1137.

Henebelle M., Balasse L., Latour A., Campeil-Potokar, Denis Stéphanie., Lavalie Monique, Gisquet-Verrier P., Denis I., Vancassel S. (2012) Influence of omega-3 fatty acid status on the way rats adapt to chronic restraint stress adapt to chronic restraint stress. *Public Library of Science*, 7 (7) e42142.

Henry S., Yip H., Ashraf-Chorassani M. (2008) Analytical scale supercritical fluid fractionation, identification of single polar lipids from deoiled soybean lecithin. *J. Sep. Sci* (31) 1290-1298.

Hibbeln J., Nieminen L., Blasbalg T., Riggs J., Lands W (2006) Healthy intakes of n-3 and n-6 fatty acids: estimations considering worldwide diversity. *American Journal of Clinical Nutrition* (83) 1483S-93S.

Hiratsuka S., Koizumi K., Ooba T., Yologoshi H. (2009) Effects of dietary docosahexaenoic acid connecting phospholipids on learning ability and fatty acid composition of the brain. *Journa of Nutrition Science and Vitaminology* 55 374-380.

Hjaltason B., Haraldsson G.G. (2006) Fish oils and lipids from marine sources. *Modifying Lipids for Use in Food*, 57-79.

■brahim M (2010) Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. *Obesity Reviews* 11 11-18.

Innis (2007) Dietary (n-3) fatty acids and brain development. *The Journal of Nutrition* 137 855-859.

ISO (International Organization for Standardization) (2001). Milk and milk products- Extraction methods for lipids and liposoluble compounds. ISO 14156:2001-IDF 172:2001. ISO Génova, Suiza.

Iso H., Kobayashi M., Ishiara J., Sasaki S., Okada K., Kita Y., Kokubo Y., Tsugane S. (2006). Intake of fish and n3 fatty acids and risk of coronary heart disease among Japanese. The Japan Public Health Center-Based study cohortI. *Circulation* 113 195-202.

Iwamoto T., Hosoda K., Hirano R., Kurata H., A. Matsumoto, W. Miki, M. Kamiyama, H. Itakura, S. Yamamoto, K. Kondo (2000) Inhibition of low-density lipoprotein oxidation by astaxanthin. *Journal of atherosclerosis, thrombosis* 7 (4) 216-222

Jacobson T (2008) Role of n-3 fatty acids in the treatment of hypertriglyceridemia and cardiovascular disease. *American Journal of Clinical Nutrition* 1981S-90S

Jana A., Hogan E., Pahan K (2009) Ceramide and neurodegeneration: susceptibility of neurons and oligodendrocytes to cell damage and death. *Journal of Neurological Sciences* 278 5-15.

Janble R.D., Magar V.P., Thorat B. N. (2013) Phosphatidylcholine, its purification from raw de-oiled soya lecithin. *Separation, Purification Techonology* 102 187-195.

Jensen R. (2002) The composition of bovine milk lipids: January 1995 to December 2000. *Journal of Dairy Science* 85 (2) 295-350

Ju S-J, Harvey H. R. (2004) Lipids as markers of nutritional condition, diet in the Antarctic krill *Euphausia superba* , *Euphausia crystallorophias* during austral winter. *Deep-Sea Research II* 51, 2199-2214.

Kihara A. (2012) Very long-chain fatty acids: elongation, physiology and related disorders. *Journa, of Biochemistry* 152 (5) 387-395.

Kim H-Y, Akbar M y Kim Y-S. (2010) Phosphatidylserine-dependent neuroprotective signaling promoted by docosaheaxaenoic acid. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 82 165-172.

Kimura R., Takahashi N., Lin S., Goto T., Murota K., Nakata R., Inoue H., Kawada T. (2013) DHA attenuates postpradial hiperlipidemia via activating PPARalpha in intestinal epithelial cells. *J of Lipid Res* 54 3258-3268.

Konagai C., Yanagimoto K, Hayamizu K, Han L, Tsuji T, Koga Y (2013). Effects of krill oil containing n-3 polyunsaturated fatty acids in phospholipid form in human brain function: a randomized controlled trial in healthy elderly volunteers. *Clinical interventions in aging* 1247-1257.

Kotronen A., Seppänen-Laakso T., Westerbacka J., Kiviluoto T., Arola J., Ruskeepää A-L., Yki-Järvinen H., Oresic M. (2010) Comparison of lipid and fatty acid composition of the liver, subcutaneous and intra-abdominal adipose tissue, and serum. *Obesity* 18 937-944.

Kratz M., Baars T., Guyenet S (2013) The relationship between high-fat dairy consumption and obesity, cardiovascular and metabolic disease. *European Journal of Nutrition* 52 1-24

Kris-Etherton P.M., Harris W.S., Appel L.J. (2003). Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids and cardiovascular disease. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*. 23 20-30.

Kristensen D., Hedegaard R. V., Nielsen J.H., Skibsted Leif (2004) Oxidative stability of buttermilk as influenced by the fatty acid composition of cows' milk manipulated by diet. *Journal of Dairy Research* DOI: 10.1017/S002202990300654X

Kuchta AM, Kelly PM, Stanton C, Derevy RA (2012) Milk fat globule membrane- a source of polar lipids for colon health? A review. *International Journal of Dairy Technology* 65 315-333

Kullenberg D., Taylor L.A., Schneider M., Massing U. (2012) Health benefits of dietary phospholipids. *Lipids in Health Diseases* 11 3

Lagarde M., Bernoud N., Brossard N., *et al.* (2001). Lysophosphatidylcholine as a preferred carrier form of docosahexaenoic acid to the brain, *Journal of Molecular Neuroscience*. MN, 16 201-221.

Lamaziere A., Richard D., Barbe U., Kefi K., Bausero P (2011) Differential distribution of DHA-phospholipids in rat brain after feeding: A lipidomic approach. *Prostaglandines, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 84 7-11.

Lamaziere A., Wolf C., Barbe U., Bausero P., Visioli F. (2013) Lipidomics of hepatic lipogenesis inhibition by omega 3 fatty acids. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 88 149-154.

Lecomte M., Bourlieu C., Meugnier E., Penhoat A., Cheillan D., Pineau G., Loizon E., Trauchessec M., Claude M., Ménard O., Gélöen A., Laugerette F., Michalski M-C. (2015) Milk polar lipids affect in vitro digestive lipolysis and postprandial lipid metabolism in mice- The Journal of Nutrition DOI: 10.3945/jn.115.212068.

Lee B., Sur B-J, Han J-J, Shim I, Her S, Lee Y-S, Lee H-J, Hahm D-H (2015). Oral administration of squid lecithin-transphosphatidylated phosphatidylserine improves memory impairment in aged rats. Prog in Neuro-Psycho & Biol Psych 56 1-10.

Lee B., Sur B-J., Han J-J., Shim I., Her S., Lee H-J., Hahm D-H (2010) Krill phosphatidylserine improves learning and memory in Morris water maze in aged rats. Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry 34 1085-1093.

Lee M-J., Wu Y., Fried S. (2013) Adipose tissue heterogeneity: Implication of depot differences in adipose tissue for obesity complications. Molecular Aspects of Medicine 34 1-11.

Lemonnier L.A., Dillehay D.L., Vespremi M.J., Abrams J., Brody E., Schmelz E.M. (2003) Sphingomyelin in the suppression of colon tumors: prevention versus intervention. Archives of Biochemistry and Biophysics. 419 129-138.

Létisse M., Rozières M., Hiol A., Sergen M., Comeau L. (2006) Enrichment of EPA, DHA from sardine by supercritical fluid extraction without organic modifier I. optimization of extraction conditions. The Journal of SCF 38 27-36.

Létondor A., Buaud B., Vaysse C., Fonseca L., Herrouin C., Servat B., Layé S., Pallet V., Alfos S. (2014) Erythrocyte DHA level as a biomarker of DHA status in specific brain regions of n-3 long-chain AGPI-supplemented aged rats. British of Journal Nutrition 112 1805-1818.

Leventis P.A., Grinstein S. (2010) The distribution and function of phosphatidylserine in cellular membranes. Annual Review of Biophysics 39 407-427.

Lieber CS (2005) Metabolism of alcohol. Clinics in Liver Disease, 9 (1) 1-35.

Lin Y-H., Brown J.A., DiMartino C., Dahms I., Salem N., Hibbeln J. (2016) Differences in long chain polyunsaturates composition and metabolism in male and female rats. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids 113 19-27.

Lister,R.G. (1987). The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. Psychopharmacology (Berl) 92, 180-185.

Little S.J., Lynch M.A., Manku M., Nicolau A. (2007) Docosahexaenoic acid-induced changes in phospholipids in cortex of Young and aged rats: A lipidomic analysis. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 77 155-162.

Liu S-H., Chang C-D., Chen P-H., Su J-R., Chen C-C., Chaung H-C. (2012) Docosahexaenoic acid and phosphatidylserine supplementations improve antioxidant activities and cognitive functions of the developing brain on pentylene-tetrazol-induced seizure model. *Brain Research* 1451 19-26.

Liu Z-Q, Shan H-Y (2006) Cholesterol, not polyunsaturated fatty acids is target molecule in oxidation induced by reactive oxygen species in membrane of human erythrocytes. *Cell Biochemistry and Biophysics* 45 185-193

Löfgren L., Stahlman M, Forberg G.B., Saarien S., Nilsson R., Hansson G.I. (2012) The BUME method: a novel automated chloroform-free 96-well total lipid extraction method for blood plasma. *J Lipid Res* 53 1690-700.

López Martínez, J., Campra Madrid, P., Guil Guerrero, J. (2004) Gamma-linolenic acid enrichment from *Borago officinalis* and *Echium fastuosum* seed oils and fatty acids by low temperature crystallization. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 97 (5) 294 – 298

Lövdén M., Xu V., Wang HX. (2013) Lifestyle change and the prevention of cognitive decline and dementia: what is the evidence? *Current Opinion in Psychiatry* 26 (3) 239-243.

Maczek C., Jurgens G., Schonitzer D., Dietrich H, Wick G(1998) Environmental influence on age-related changes of human lymphocyte membrane viscosity using severe combined immunodeficiency mice as an in vivo model. *Experimental Gerontology* 33 485-498

Maillard V., Bougnoux P., Ferrari P., Jourdan M-L., Pinault M., Lavillonniere FF, Body G., Le Floch O, Chajes V (2002). N-3 and n-6 fatty acids in breast adipose tissue and relative risk of breast cancer in a case-control study in Tours, France. *International Journal of Cancer* 98 78-83.

Maki K.C., Reeves M.S., Garmer M., Griinari M., Berge K., Vik H., Hubacher R., Rains T.M. (2000) Krill oil supplementation increases plasma concentrations of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in overweight and obese men and women. *Nutrition Research* 29 609-615.

Marks N., Berg M., Saito M., Saito M (2007) Glucosylceramide synthase decrease in frontal cortex of Alzheimer brain correlates with abnormal increase in endogenous ceramides: Consequences to morphology and viability on enzyme suppression in cultured primary neurons. *Brain Research* 1191 136-147.

Martínez-Beamonte R., Navarro M.A., Acin S., Guillén N., Barranquero C., Arnal C., Surra J., Osada J., (2013) Postprandial changes in high density lipoproteins in rats subjected to gavage administration in virgin olive oil. *PLOS* 8 1 e55231.

Martins S.V., Lopes P.A., Alfaia C., Rodrigues P.O., Alves S., Pinto R., Castro M., Bessa R., Prates J. (2010) Serum lipid adipokine profile and fatty acid composition of adipose tissues are affected by conjugated linoleic acid and saturated fat diets in obese Zucker rats. *British Journal of Nutrition* 103 869-878.

Mataix Verdu J (2001) *Aceite de oliva virgen: nuestro patrimonio alimentario*. ISBN 10: 8433827375 2001

Mathieu G., Oualian C., Denis I., Lavalie M., Gisquet-Verrier P., Vancassel S. (2011) Dietary n-3 polyunsaturated fatty acid deprivation together with early maternal separation increases anxiety and vulnerability to stress in adult rats. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 85 129-136.

McDaniel M., Maier S.F., Einstein G.O. (2003). "Brain-specific" nutrients: a memory cure? *Psychological Science in the Public Interest* 3:11.

McQuaid, S., Humphreys, S., Hodson, L., Fielding, B., Karpe, F. & Frayn, K. (2010). Femoral adipose tissue may accumulate the fat that has been recycled as VLDL and nonesterified fatty acids. *Diabetes* 59, 2465–2473.

Mendes A., Lopes da Silva T., Reis A. (2007) DHA concentration, purification from the marine heterotrophic microalga *Cryptocodinium cohnii* CCMP 316 by winterization, urea complexation. *Food technol. Biotechnol.* 45 38-44.

Merrill A.H. (2011) Sphingolipid and glycosphingolipid metabolic pathways in the Era of Shingolipids. *Chemical Reviews* 111 6387-6422.

Miles E. and Calder P. (2012) Influence of marine n-3 polyunsaturated fatty acids on immune function and a systematic review of their effects on clinical outcomes in rheumatoid arthritis. *British Journal of Nutrition* 107 171-184

Miranda D., Batista V., Grando F., Paula F., Felicio C., Rubbo A., Fernandes G., Curi L., Nishiyama A (2008) Soy lecithin supplementation alters macrophage phagocytosis and lymphocyte response to concanavalin A: a study in alloxan-induced diabetic rats. *Cell Biochemistry and Function* 26 859-865

Morales J., Valenzuela R., González D., González M., Sanhueza J., Valenzuela A. (2012) Nuevas fuentes de ácido alfa-linolénico: una visión crítica. *Revista Chilena de Nutrición* Vol 39 N°3.

Moreira J., Knorr L., Ganzella M., Thomazi A.P., de Souza C., de Souza, Pitta C., e Souza T.M., Wofchuk S., Elisabetsky E., Vinadé L., Perry M., O. Souza Diogo (2010). Omega-3 fatty acids deprivation affects ontogeny of glutamatergic synapses in rats: relevance for behavior alterations. *Neurochemistry International* 56 753-759.

Mori T.A., Burke V., Puddey I.B., Watts G.F., O'Neal D.N., Best J.D., Beilin L.J. (2000). Purified eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids have differential effects in serum lipids and lipoproteins, LDL, particle size, glucose, and insulin in mildly hyperlipidemic men. *American Journal of Clinical Nutrition*. 71 1085-1094.

Morin P., Pouliot Y., Jiménez-Flores R. A (2006) A comparative study of the fractionation of regular buttermilk, whey buttermilk by microfiltration. *Journal of Food Engineering* (77) 521-528.

Mozzi R., Burrata s., Goracco G. (2003). Metabolism and functions of phosphatidylserine in mammalian brain. *Neurochemistry Research*. 28 195-214.

Muhlhausler B.S., Cook-Johnson R., Jannes M., Miljkovic D., Duthoit., Gibso R. (2010) Opposite effects of Omega-3 and Omega-6 long chain polyunsaturated fatty acids on the expression of lipogenic genes in omental and retroperitoneal adipose depots in the rat. *Journal of Nutrition and Metabolism*, Article ID 927836, 9 pages.

Nagan N., Zoeller R. (2001) Plasmalogens: biosynthesis and functions. *Progress in Lipid Research* 40 199-229.

Nagao K., Yanagita T. (2008) Bioactive lipids in metabolic syndrome. *Progress in Lipid Research* 47 127-146.

Nardelli T., Ribeiro R., Balbo S., Vanzela E., Carneiro E., Boscherio A., Bonfleur M (2011) Taurine prevents fat deposition and ameliorates plasma lipid profile glutamate-obese rats. *Amino Acids* 41 901-908.

Nestel P J., Straznicky N., Mellet A., Wong G., De Souza D. P., Tull D. L., Barlow C. K., Grima M.T., Meikle P.J. (2014) Specific plasma lipid classes and phospholipid fatty acids indicative of dairy food consumption associate with insulin sensitivity. *Am J Clin Nutr* 99 46-53.

Nestel P. J., Mellett N., Pally S., Wong G., Barlow C., Croft K., Mori T.A., Meikle P. (2013) Effects of low-fat or full-fat fermented and non-fermented dairy foods on selected cardiovascular biomarkers in overweight adults. *British Journal of Nutrition*, 110 2242-2249.

Nguyen P., Leray., Diez M., Serisier S., Le Bloch J., Siliart ., Dumon H. (2008) Liver lipid metabolism. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 92 272-283.

Nielsen H. (2007) Production of phospholipids from spray-dried egg yolk by consecutive in situ solid phase extraction with acetone, ethanol. *LWT- Food Science, Technology* 40, 1337-1343.

Numomura A., Tamaoki T., Motohashi N., Nakamura M., McKeel D., Tabaton M., Lee H-g., Smith M., Perry G., Zhu X. (2012) The earliest stage of cognitive impairment in transition from normal aging to Alzheimer disease is marked by prominent RNA oxidation in vulnerable neurons. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 71 (3) 233-241.

Ohlsson L., Burling H., Nilsson A. (2009) Long term effects on human plasma lipoproteins of a formulation enriched in butter milk polar lipid. *Lipids in Health and Disease*. 8 1-12.

Ollivier D., Artaud J., Pinatel C., Durbec J-P., Guérèr (2006) Differentiation of French virgin olive oil RDOs by sensory characteristics, fatty acid and triacylglycerol compositions and chemometrics. *Food Chemistry* 97 382-393.

Oosting A., Kegler D., Wopereis H.J. (2012) Size and phospholipid coating of lipid droplets in the diet of young mice modify body fat accumulation in adulthood, *Pediatric Research*. 72 362–369.

Palacios L. E., Wang T. (2005) Egg-yolk lipid fractionation , lecithin characterization. *JAACS* 82, 571-578.

Parletta N, Milte CM, Meyer BJ (2013) Nutritional modulation of cognitive function and mental health. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 24 (5) 725-743.

Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods*. 1985 Aug;14(3):149-67.

Pimentel L., Gomes A., Pintado M., Rodríguez-Alcalá L.M. (2016) Isolation and analysis of phospholipids in dairy foods. *Journal of Analytical Methos in Chemistry*. <https://dx.doi.org/10.1155/2016/9827369>

Piscitelli F., Carta G., Bisono T., Murru E., Cordeddu L., Berge K., Tandy S., Cohn, Griinari M., Banni S., Di Marzo V. (2011) Effect of dietary krill oil supplementation on the endocannabinoidome of metabolically relevant tissues from hihgfat-fed mice. *Nutrition and Metabolism* 8 51.

Polanco A., Vargas-Irwin C., Góngora M.E. (2011) Modelos Animales: una revisión desde tres pruebas utilizadas en ansiedad. *Suma Psicológica*, 18 141-148.

Pons A., Popa J., Portokalian J., Bodennec J., Ardail D., Kol O., Martin-Martin M., Hueso P., Timmerman P., Leroy Y., Zanetta J-P. (2000) Single-step gas chromatography-mass spectrometry analysis of glicolipid constituents as heptafluorobutyrate derivatives with a special reference to the lipid portion. *Analytical Biochemistry* 284 201-216.

Rahman T., Taha A., Song B-J., Orr S., Liu Z., Chen C., Bazinet R. (2010) The very low density lipoprotein receptor is not necessary for maintaining brain polyunsaturated fatty acid concentrations Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids. 82 141-145.

Rahman T., Taha A.Y., Song B.J., Orr S.K., Liu Z., Chen C., Bazinet R. (2010) The very low density lipoprotein receptor is not necessary for maintaining brain polyunsaturated fatty acid concentrations. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids 82 141-145.

Rajasekaran S., Ravi K., Sivagnanam K., Subramanian S. (2006) Beneficial effects of *Aloe vera* leaf gel extract on lipid profile status in rats with streptozotocin diabetes. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 33 232-237.

Ramprasath V., Jones P., Buckley D., Woollett L. and Heubi J. (2013). Effect of dietary sphingomyelin on absorption and fractional synthetic rate of cholesterol and serum lipid profile in humans. *Lipid in Health and Disease*. 12 125.

Reagan-Shaw S., Nihal M., Ahmad N. (2008) Dose translation from animal to human studies revisited. *The FASEB Journal*. Life 22 (3) 659-661

Reddy J. y Rao M.S. (2006) Lipid metabolism and liver inflammation. *American Physiological Society* 290: G852-G858

Reis M.G., Roy N.C., Bermingham E.N, Ryan L., Bibiloni R., Young W., Krause L., Berger B., North M., Stelwagen K., Reis M.M. (2013) Impact of dietary dairy polar lipids on lipid metabolism of mice fed a high-fat diet. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61 2729-2738

Riediger N., Othman R.A., Suh M., Moghadasian M.H. (2009) A systemic review of the roles of n-3 fatty acids in health and disease. *Journal of American Diet Association* 109 668-679

Rizos E.C. y Elisaf M.S. (2013) Current evidence and future perspectives of omega 3 polyunsaturated fatty acids for the prevention of cardiovascular disease. *European Journal of Pharmacology*, 706 1-3

Rodríguez-Alcalá L. M, Fontecha J (2007). Hot topic: Fatty acid conjugated linoleic acid (CLA) isomer composition of commercial CLA-fortified dairy products: Evaluation after processing, storage. *Journal of Dairy Science*, 90(5), 2083-2090.

Rodriguez-Alcalá L.M., Fontecha J. (2010). Major lipid classes separation of buttermilk, and cows, goats, and ewes milk by high performance liquid chromatography with an evaporative light scattering detector focused on the phospholipid fraction. *Journal of Chromatography A*. 1217 3063-3066.

Rodriguez-Alcalá LM., Ares I., Fontecha J., Juárez M., Castellano V., Martínez-Larrañaga MR., Anadón A., Aránzazu Martínez M (2015) Oral absorption and disposition of alpha-linolenic, rumenic and vaccenic acids after administration as a naturally enriched goat dairy fat to rats. *Lipids* 50 659-666.

Rogers GN, Herrler G, Paulson JC, Klenk HD. (1986) Influenza C virus uses 9-O-acetyl-N-acetylneuraminic acid as a high affinity receptor determinant for attachment to cells. *Journal of Biology and Chemistry* 261: 5947–5951.

Rombaut R., Dewettinck K., Van Camp J. (2007) Phospho- sphingolipid content of selected dairy products as determined by HPLC coupled to an evaporative light scattering detector (HPLC-ELSD). *Journal of Food Composition, Analysis* (20) 308-312.

Rombaut R., Dewewttinck K. (2006). Properties, analysis and purification of milk polar lipids. *International Dairy Journal*, 1362-1373.

Scheltens P., Kamphius G., Verhey F., Olde Rikkert., Wurtman R., Wilkinson D., Twisk J., Kurz A (2010) Efficacy of a medical food in mild Alzheimer's disease: A randomized, controlled trial. *Alzheimer and Dementia* 6 1-10

Schmelz E.M. (2004) Sphingolipids in the chemoprevention of colon cancer. *Frontiers in Bioscience: A virtual library of medicine* 9 2632

Schnaar R., Gerardy-Schahn R., Hildebrandt H (2014) Sialic acids in the brain: gangliosides and polysialic acid in nervous system development, stability, disease and regeneration. *Physiology Review* 94 461-518.

Schuchardt J.P., Scheneider I, Meyer H., Neubronner J., von Schacky C., Hahn A (2011) Incorporation of EPA and DHA into plasma phospholipids in response to different omega-3 fatty acid formulations- a comparative bioavailability study os fish oil vs. krill oil. *Lipids in Health and Disease* 10 145

Schwellenbach L.J., Olson K.L., McConnell K.J., Stolcpart R.S., Nash J.D., Merenich J.A. (2006). The triglyceride-lowering effects of a modest dose of docosahexaenoic acid alone vs in combination with low dose eicosapentaenoic acid in patients with coronary artery disease and elevated triglycerides. *The Journal of American College if Nutrition*. 25 480-485.

Sevastou I., Kaffe E., Mouratis M-A., Aidinis V. (2013) Lysoglycerophospholipids in chronic inflammatory disorders: The PLA2/LPC and ATX/LPA axes. *BBA Molecular and Cell Biology of Lipids* 1831 42-60

Shannon J., King IB, Moshofskky R, Lampe JW, Li Gao D, Ray RM, Thomas DB (2007). Erythrocyte fatty acids and breast cancer risk: a case-control study in Shangai, China. *American Journal of Clinical Nutrition* 85 1090-1097.

Shohet S. (2012). Lipid metabolism in mammals. Chapter: Red blood cells. ISBN 978-1-4684-2834-6.

Simopoulos A.P. (2009). The importance of the omega-6/ omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. DOI: 10.3181/0711-MR-311 1535-3702/08/2336-0674\$15.00

Singal A.K., Jampana S.C., Weinman S.A. (2011) Antioxidants as therapeutic agents for liver disease. *Liver International*. 31 1432-1448.

Singh H. (2005). The milk fat globule membrane- A biophysical system for food applications. *Current Opinion in Colloid y Interface Science*. 11 154-163

Sinibaldi L., Goldoni P., Pietropaolo V., Cattani L., Peluso C, Di Taranto (1992) Role of phospholipids in BK virus infection and haemagglutination. *Microbiology* 14 337-344

Sinn N, Milte C.M., Street S.J., Buckley J.D., Coates A.M., Petkov J., Howe P.R. (2012). Effects of n-3 fatty acids, EPA v. DHA, on depressive symtoms, quality of life, memory and executive function in older adults with mild cognitive impairment: a 6-month randomized controlled trial. *British Journal of Nutrition* 107 (11) 1682-93.

Smith E., y Kosslyn S. (2007) *Cognitive Psychology: Mind and brain*. ISBN-13: 978-0205701476.

Snow D., Jimenez-Flores R., Ward R., Cambell J., Young M., Nemere I., Hintze J. (2010) Dietary milk fat globule membrane reduces the incidence of aberrant crypt foci in Fischer-344 rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58 2157-2163.

Sodini I., Morin P., Olabi A., Jiménez-Flores. (2006) Compositional, functional properties of buttermilk: a comparison between sweet, sour, whey buttermilk. *Journal Dairy Science* (89) 525-539.

Soleimanian Y., Sahari M. A., Barzegar M. (2015) Influence of processing parameters on physicochemical properties of fractionated fish oil at low temperature crystallization. *Nutr Food Science*, 45 (1) 2-19.

Solstad T., Boccara CN., Kropff E., Moser MB., Moser EI (2008). Representation of geometric borders in the entorhinal cortex. *Science* 322 1865-1868.

Spence AJ, Jimenez-Flores R, Qian M, Goddik L. (2009). Phospholipid enrichment in sweet whey cream buttermilk powders using supercritical fluid extraction. *J Dairy Sci*, 92(6), 2373-2381.

Spitsberg V.L. (2005). Invited review: Bovine milk fat globule membrane as a potential nutraceutical. *Journal of Dairy Science* 88(7) 2289-2294.

Sprong R., Hulstein M., Lambers T., van der Meer R. (2012) Sweet buttermilk intake reduces colonization and translocation of *Listeria monocytogenes* in rats by inhibiting mucosal pathogen adherence. *British Journal of Nutrition* 108 2026-2033.

Sprong RC, Hulstein MF, van der Meer R. (2001). Bactericidal activities of milk lipids. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 45 1298-1301.

Squire y Schacter (2002) *The Neuropsychology of Memory*, Guilford Press

Stough C., Downey L., Silber B., Lloyd J., Kure C., Wesnes K., Camfield D. (2012) The effects of 90-day supplementation with the omega-3 essential fatty acid docosahexaenoic acid (DHA) on cognitive function and visual acuity in a healthy aging population. *Neurobiology of Aging* 33 824e1-824e3.

Subra-Paternault P., ThongDeng H., Grélard A., Cansell M. (2015) Extraction of phospholipids from scallop by-product using supercritical CO₂/ alcohol mixtures. *LWT-Food Science, Technology* 60, 990-998.

Suzuki y Shibata (1990) The utilization of Antarctic krill for human food. *Food Review International* 6 119-147

Tandy S., Chung R., Wat E., Kamili A., Berge K., Griinari M., Cohn J. (2009) Dietary krill oil supplementation reduces hepatic steatosis, glycemia and hypercholesterolemia in high-fat-fed mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57 9339-9345.

Trofimiuk y J.J. Braszko (2011) Long-term administration in cod liver oil ameliorates cognitive impairment induced by chronic stress in rats. *Lipids* 46 417-423.

Ulven S.M., Kirkhus B., Lamglait A., Basu S., Elind E., Haider T., Berge K., Vik H., Pedersen J. I. (2011). Metabolic effects of krill oil are essentially similar to those of fish oil but a lower dose of EPA and DHA, in healthy volunteers. *Lipids* 46 37-46.

Vajn K., Viljetic B., Degmecic I., Schnaar R., Heffer M (2013) Differential distribution of major brain gangliosides in the adult mouse central nervous system. *Public Library of Science* 8 (9) 1-11.

Vakhapova V., Cohen T., Richter Y., Herzog Y., Korczyn AD (2010) Phosphatidylserine containing omega-3 fatty acids may improve memory abilities in non-demented elderly with memory complaints: a double blind placebo-controlled trial.

Valenzuela R., Morales J., Sanhueza J., Valenzuela A. (2013). Ácido docosahexaenoico, un ácido graso esencial a nivel cerebral. Revista Chilena de Nutrición Vol 40 Num 4.

Vance D.E., y Vance J.E. (2008). Chapter 8- Phospholipid biosynthesis in eukaryotes. Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes (5th Ed.), Elsevier, San Diego, 213-215.

Vanderghem C., Bodson P., Danthine S., Paquot M., Deroanne C., Blecker C (2010) Milk fat globule membrane and buttermilks: From composition to calorization. 14 (3) 485-500

VanElzakker M.B., Fevurly R.D., Breindel T., Spencer R.L. (2008) Enviromental novelty is associated with a selective increase in Fos expression in the output elements of the hipocampal formation and the perirhinal cortex. Learning and Memory 15 899-908.

Vázquez L. y Akoh C. (2011) Concentration of stearidonic acid in free datty acid and fatty acid ethyl ester forms from modified soybean oil by winterization. Journal of the American Oil Chemists's Society 88 1775-1785.

Veereman-Wauters, Staelens G.S., Rombaut R., Dewettinck K., Deboutte D., Brummer R.- J., Boone M., Le Ruyet P. (2012). Milk fat globule membrane (INPULSE) enriched formula milk decreases febrile episodes and may improve behavioral regulation in young children. Nutrition 28 749–752.

Vigerust N., Bjorndal B., Bohov P., Brattelid T., Svardal A., Berge R.K. (2013) Krill oil versus fish oil modulation of inflammation and lipid metabolism in mice transgenic for TNF-alpha. European Journal of Nutrition 52 1315-1325.

Villanueva M., Yokoyama W., Hong Y., Barttley G., Rupérez P. (2011) Effect of high-diet supplemented with okara soybean by-product on lipid profiles of plasma, liver and faeces in Syrian hamsters. Food Chemistry 124 72-79.

Waldemar T., (2002). Egg lipids, in: Chem, Funct, Prop. Food Lipids, CRC Press.

Walker, G., Verti, B., Marzullo, P., Savia, G., Mencarelli, M., Zurleni, F., Liuzzi, A. & Di Blasio, A. (2007). Cellular and molecular deep subcutaneous adipose tissue: a distinct abdominal adipose depot. *Obesity* 15, 1933–1943

Wang X., Andersson R., Soltesz V., Wang W., Ar'rajab A, Bengmark S (1994) Phospholipids prevent enteric bacterial translocation in the early stage of experimental acute failure in the rat. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 28 1117-1121

Wat E., Tandy S., Kaper E., Kamili A., Chung R.W.S, Brown A., Rowney M., Cohn J.S. (2009) Dietary phospholipid-rich dairy milk extract reduces hepatomegaly, hepatic steatosis and hyperlipidemia in mice fed a high-fat diet. *Atherosclerosis* 205, 144–150.

Watanabe S., Takahashi T., Tanaka L., Hauta Y., Shiota M., Hosokawa M., Miyashita K. (2010) The effect of mil polar lipids separated from butter serum on the lipid levels in the liver and the plasma of obese-model mouse (KK-AA^y). *Journal of Functional Foods* 3 313-320.

Werth R (2006) Visual functions without the occipital lobe after cerebral hemispherectomy in infancy. *European Journal of Neuroscience*, 24 2932-2944.

Wibrand K., Berge K., Messaoudi M., Duffaud A., Panja D., Bramham C., Burri L (2013) Enhanced cognitive function and antidepressant-like effects after krill oil supplementation in rats. *Lipids in Health and Disease* 12:6

Winter B., Hoem N., Berge K., Reubsaet L (2010) Elucidation of phosphatidylcholine composition in krill oil extracted from *Euphausia superba*. *Lipids* 46 25-36.

Wong A., Sagar D., Ortori C., Kendall D., Chapman V., Barrett D.A., (2014) Simultaneous tissue profiling of eicosanoid and endocannabinoid lipid families in a rat model of osteoarthritis. *Journal of Lipid Research* 55 1903-1913.

Wu Y., Wang T. (2004) Fractionation of crude soybean lecithin with aqueous ethanol. *Journal of American Chemical Society* (81) no. 7

Yamashita A., Oka S., Tanikawa T., Hayashi Y., Nemoto-Sasaki, Sugiura T. (2013) The actions and metabolism of lysophosphatidylinositol, an endogenous agonist for GPR33. *Prostaglandins and other Lipid Mediators* 103-106.

Yokoyama M., Origasa H., Matsuzaki M., Matsuzawa Y., Satio Y., Ishikawa Y., Oikawa S., *et al.* (2007). Effects of eicosapentaenoic acid on major coronary events in hypercholesterolaemic patients (JELIS): a randomized, open-label, blinded endpoint analysis. *Lancet* 369 1090-1098.

Yoshitomi B., Aoki M., Oshima S-I, Hata K.g (2006) Evaluation of krill (*Euphausia superba*) meal as a partial replacement for fish meal in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) diets. *Aquaculture* 261 440-446.

Yu-Hong L., Brown J., DiMartino C., Dahms I., Salem N., Hibbeln J (2016) Differences in long chain polyunsaturated composition and metabolism in male and female rats. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 113 19-27.

Zanabria R., Tellez A., Griffiths M., Corredig M. (2014). The antiproliferative properties of the milk fat globule membrane are affected by extensive heating. *Dairy Science Technology*. 94 439-453.

Zhang P., Li B., Gao S., Duan R.D. (2008). Dietary sphingomyelin inhibits colonic tumorigenesis with an up-regulation of alkaline sphingomyelinase expression in ICR mice. *Anticancer Research*. 28 3631-3635.

Zhang Y., Yang L., Guo L. (2015) Effect of phosphatidylserine on memory in patients and rats with Alzheimer's disease. *Genetics and Molecular Research* 14 (3) 9325-9333.

Zhao J., Wei S., Liu F., Liu D. (2014) Separation and characterization of acetone-soluble phosphatidylcholine from Antarctic krill (*Euphausia superba*) oil. *Eur Food Res Technol* 238 1023-1028.

Zhou A., Hintze K.J., Jimenez-Flores R., Ward R.E. (2012) Dietary fat composition influences tissue lipid profile and gene expression in Fischer-344 rats. *Lipids* 47 1119-1130.

Zhu D., Damodaran S. (2013) Dairy lecithin from cheese whey fat globule membrane: its extraction, composition, oxidative stability and emulsifying properties. *JAACS* 90 217-224.